



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ESTUDOS IMUNOISTOQUÍMICOS DOS SISTEMAS DE
ALARME DE PREDÇÃO E SUFOCAMENTO E SUA
RELAÇÃO COM PÂNICO RESPIRATÓRIOS E NÃO-
RESPIRATÓRIOS**

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas
Cláudia Janaina Torres Müller

Orientador:
Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Vitória, ES
2016

**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, para
obtenção do título de Doutor em
Ciências Fisiológicas.**

Vitória, 27 de junho de 2016.

Müller, CJT

ESTUDOS IMUNOISTOQUÍMICOS DOS SISTEMAS DE
ALARME DE PREDACÃO E SUFOCAMENTO E SUA
RELAÇÃO COM PÂNICO RESPIRATÓRIO E NÃO-
RESPIRATÓRIO

Cláudia Janaina Torres Müller – Vitória, 2016.

Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

1- Matéria cinzenta periaquedutal, 2- Imunoreatividade,
3- c-Fos, 4- Pânico, 5- Fobia, 6- Alarme de sufocamento,
7-Exposição ao gato, 8- Ansiedade de Separação,
9- Estresse na Infância

**ESTUDOS IMNUNOISTOQUÍMICOS DOS SISTEMAS DE ALARME DE
PREDÇÃO E SUFOCAMENTO E SUA RELAÇÃO COM PÂNICO
RESPIRATÓRIO E NÃO-RESPIRATÓRIO**

Cláudia Janaina Torres Müller

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do Título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg (Orientador-UFES)

Prof. Dr. Newton Sabino Canteras – ICB- USP

Profa. Dra. Vanessa Benjamini Harres - UFES

Profa. Dra. Valquíria Camin de Bortoli

Profa. Dra. Ester Miyuki Nakamura Palácios

Coordenador do PPGCF – Prof^a Dr^a Alessandra Simão Padilha

Vitória, 27 de junho de 2016.

**Dedico esta tese àqueles que sempre me encorajaram nesta batalha:
meus pais, meu esposo, meus irmãos, meus alunos e ex-alunos e meus
amigos.**

AGRADECIMENTOS

Como disse Raul Seixas na música Prelúdio “Sonho que se sonha só é só um sonho ... Sonho que se sonha junto é realidade.” Por isso tenho uma lista grande de agradecimentos.

Queria começar agradecendo meus pais, pois foi com eles que aprendi o valor do estudo e que trabalho duro traz grandes recompensas. Agradecer a tudo o que fizeram por mim para que eu chegasse até aqui. Sei o quanto batalharam para dar a mim e meus irmão uma vida digna.

Agradeço aos meus irmãos e irmã, do nosso jeito, meio sem jeito, estamos sempre nos incentivando a ir atrás de nossos sonhos.

Não posso deixar de agradecer ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas. Todos os laboratórios contribuíram de alguma forma, para esta tese, com uma água destilada, um reagente, um equipamento, um biotério de passagem (valeu prof. Helder), ou simplesmente com uma dica que resolvia muitos problemas. Sempre fui recebida de braços abertos por todos. Em especial, gostaria de agradecer à Prof. Ivanita Stefanon, minha eterna coordenadora do PPGCF. Vendo-me sem lugar para trabalhar com o gato, gentilmente me cedeu um espaço onde desenvolvi vários trabalhos, e um deles, apresento nesta tese. Aproveito para agradecer aos funcionários do programa e da UFES, bem como as meninas da limpeza (são tantas, que não dá para citar o nome de todas), o Fonseca, o Rodolfo (veterinário), o pessoal do LHMI (Juliana, Daniele e Mário), o pessoal do biotério (Seu Marildo e João) e a Luciene.

Tenho um especial agradecimento aos professores Athelson Bitencourt, Vanessa Beijamini, Nyan Florencio da Silva e Livia Melo. O Athelson

Bittencourt foi meu professor de curso pré-vestibular, apresentou-me a neurociência e sempre me incentivou e vibrou com minhas conquistas acadêmicas. A professora Vanessa, foi minha co-orientadora '*off-line*', ou melhor, foi uma amiga. Sempre me ajudando nas minhas dúvidas de procedimento, orientando-me quanto aos grupos controles e também me dando importantes conselhos pessoais e profissionais. Valeu mesmo Vanessa, seus conselhos foram muito importantes. O professor Nyan é mais que um professor, é um amigão que UFES me deu. Não importava, fizesse chuva ou sol, nunca me negou nenhuma ajuda. A professora Lívia, com seu sorriso encantador sempre me ajudou no que precisei.

Gostaria de agradecer as minhas irmãs de laboratório Fagna e Jeyce. Dizem que os amigos são a família que escolhemos e estas duas foram praticamente minha irmã mais nova (Fagna) e minha irmã mais velha (Jeyce). A Jeyce eu tenho um especial agradecimento, primeiro por me apresentar a c-Fos, trabalho salvador do doutorado, e segundo, pela parceria. Parceria nas imuno, em trazer e levar o gato, nas dicas para experimento, sem contar os conselhos, eram horas ao telefone às vezes. Esse trabalho é nosso Jeyce. Aproveito para agradecer a Ana Cristina e a Ranna. Ranna minha melhor IC, sem sua ajuda esse trabalho teria sido mais difícil.

Falando em amigos, tem que agradecer aos amigos de fora do laboratório em especial a Roge, a Adriana, a Selma e o Ernandes. A esses tenho que não só agradecer pela força, mas me desculpar pelos sumiços. Foram muitos fins de semana separando e manipulando ratos, preparando reagente e por fim escrevendo a tese. Obrigado amigos sei o quanto torceram por mim.

Também gostaria de agradecer a Dona Nalvinha, ao Alexandre e a Jaqueline que cederam sem pestanejar seus gatinhos.

Agradeço, é claro, ao prof. Luiz Carlos Schenberg, são 14 anos juntos, da iniciação científica ao doutorado. Obrigado pelas oportunidades e desculpe pelas deficiências. E em especial, gostaria de agradecer pela paciência nas últimas semanas, sei que dei trabalho, mas aprendi muito.

Por fim quero agradecer ao meu marido, amigo e amante Sandro Ricardo de Souza, não necessariamente nessa ordem. Neste doutorado quase inventamos a vídeo conferência por 4-D e a distância reforçou ainda mais o nosso amor. Sem eles (o Sandro e o nosso amor) não teria conseguido chegar ao final deste doutorado, em meio ao desespero dos resultados negativos, ou pior, da falta de resultados, foi nele que encontrei sanidade e calma para resolver a enxurrada de problemas que enfrentei ao longo dos 5 anos do doutorado. Sem contar o conforto dos carinhos nos momentos de desespero. Te amo!

Ah, não posso deixar de agradecer aos ratinhos, que irremediavelmente cederam suas vidas e cérebros para este doutorado. Sem eles com certeza nada teria sido possível.

Ufa! Espero agora não ter esquecido de ninguém.

“A verdade de hoje é o caso particular de amanhã.”

(Otto Koehler)

ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
8-OH-DPAT	8-hidroxi-2-(di- <i>n</i> -propilamino)tetralina
µg	microgramas
dB	decibéis
pmol	picomol
ABMp	Amígdala basomedial posterior
ACe	Amígdala central
AChE	Acetilcolinesterase
AFS	Alarme falso de sufocamento
AMe	Amígdala medial
AMepv	Amígdala medial posteroventral
ANOVA	Análise de variância
AP	Ataque de pânico
APA	Associação Psiquiátrica Americana
APBI	Área parabraquial lateral
APOME	Área pré-óptica medial
ASI	Ansiedade de separação da infância
BLA	Amígdala basolateral
CCK	Colecistocinina
CnF	Núcleo Cuneiforme
CO ₂	Dióxido de carbono
CpBö	Complexo pré-Bötzinger
CTR	Controle
DAB	Diaminobenzidina
DSM	Manual de diagnóstico e estatística da APA
ED ₅₀	Dose mediana
EDM	Endomorfina
EP	Erro padrão
FLI	Imunorreatividade c-Fos
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLU	Glutamato
HA	Hipotalâmico anterior

HbLm	Habênula lateral medial
HDG	Hipótese de Deakin & Graeff
HDM	Hipotálamo dorsomedial
HL	Hipotálamo lateral
HVMdm	Hipotálamo ventromedial dorsomedial
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
INF	Isolamento neonatal fictício
INS	Isolamento neonatal social
IRF	Imunorreatividade c-Fos
KCN	Cianeto de potássio
LA	Amígdala lateral
LC	Locus cerúleo
LDTg	Núcleo laterodorsal tegmental
MCPA	Matéria cinzenta periaquedutal
MCPA _{ce}	Matéria cinzenta periaquedutal central
MCPA _{dl}	Matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral
MCPA _{dm}	Matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial
MCPA _l	Matéria cinzenta periaquedutal lateral
MCPA _{lc}	Matéria cinzenta periaquedutal laterocaudal
MCPA _{lr}	Matéria cinzenta periaquedutal laterorostral
MCPA _{vl}	Matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral
MCPA _{vlc}	Matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral caudal
MCPD	Matéria cinzenta periaquedutal dorsal
NADPH	Dinucleotídeo reduzido da adenina e nicotinamida
NADPHd	Diaforase do NADPH
NDR	Núcleo dorsal da rafe
NMnR	Núcleo mediano da rafe
NMR	Núcleo magno da rafe
NRA	Núcleo retroambíguo
NTS	Núcleo do trato solitário
NTSc	Núcleo do trato solitário caudal
O ₂	Oxigênio
PBS	Tampão fosfato

PMd	Núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo
PN	Pós natal
PVTa	Núcleo paraventricular do tálamo anterior
RCB	Ratos controle de biotério
SLv	Septo lateral ventral
SVB	Superfície ventral do bulbo
TAG	Transtorno de ansiedade generalizada
TAS	Transtorno de ansiedade social
TH	Tirosina hidroxilase
TP	Transtorno de pânico

ÍNDICE

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	04
INTRODUÇÃO.....	07
1- Hipótese do Transtorno de Pânico.....	08
2- Pânico e Ansiedade de Separação na Infância.....	10
3- Pânico e Fobia.....	12
4- Imunohistoquímicos do Sufocamento e da Predação.....	14
4.1- Áreas Cerebrais Ativadas por Hipóxia e Hipercapnia.....	14
4.2- Áreas Cerebrais Ativadas pela Exposição de Roedores ao Predador ou ao seu Odor.....	17
5- Modelos Animais de Pânico.....	18
5.1- Pânico Não-respiratório por Exposição ao Predador	19
5.2- Pânico Não-respiratório por Estimulação Elétrica da Matéria Cinzenta Periaquedutal.....	20
5.3- Pânico Respiratório por Cianeto de Potássio Endovenoso	21
OBJETIVOS.....	24
Objetivo Geral.....	25
Objetivo Específico.....	25
ESTUDOS.....	26
Estudo I:	
À beira de um ataque de pânico do tipo respiratório: ativação seletiva da matéria cinzenta periaquedutal, núcleo tegmental laterodorsal e do núcleo do trato solitário após fuga de curta duração à doses baixas de cianeto de potássio.....	27
Resumo.....	28

Abstract.....	30
1- Introdução.....	31
2- Material e métodos.....	36
2.1- Animais.....	36
2.2- Canulação da veia jugular para administração endovenosa de KCN	36
2.3- Quimitrodos.....	36
2.4- Implantação do quimitrodo.....	37
2.5- Administração de CO ₂	38
2.6- Protocolo experimental.....	38
2.6.1- Administração endovenosas de KCN.....	38
2.6.2- Injeções intra-periaquedutal de KCN.....	39
2.7- Efeitos das microinjeções de KCN sobre os comportamen- tos defensivos induzidos por estimulação elétrica.....	39
2.8- Imunoistoquímica c-Fos.....	40
2.9- Contagem das células.....	41
2.10- Estatísticas.....	42
2.10.1- Efeitos do CO ₂ sobre o comportamento de fuga evocado por KCN.....	42
2.10.2- Efeitos das microinjeções de KCN na MCPD.....	42
2.10.3- Efeitos do CO ₂ e do KCN na expressão da proteína c-Fos.....	42
3- Resultados.....	43
3.1- Efeitos comportamentais da administração de KCN e/ou CO ₂	43
3.2- Efeitos da administração de KCN e CO ₂ na expressão de c-Fos na MCPA.....	45

3.3- Efeitos da administração de KCN e CO ₂ na expressão de c-Fos no NTS e no APBI.....	48
4- Discussão.....	52
Estudo II:	
Isolamento Social Neonatal produz aumentos seletivos da imunorreatividade à proteína c-Fos da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral e do núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo de ratos adultos expostos a um gato.....	61
Resumo.....	62
Abstract.....	64
1- Introdução.....	66
2- Material e métodos.....	71
2.1- Animais.....	71
2.2- Isolamento Social Neonatal.....	71
2.3- Aparato de exposição ao gato.....	72
2.4- Procedimento.....	73
2.5- Protocolo de imunoistoquímica c-Fos.....	73
2.6- Análise histológica.....	74
2.7- Registros comportamentais.....	74
2.8- Análise Estatística.....	76
3- Resultados.....	77
3.1- Comportamentos.....	77
3.2- Imunorreatividade c-Fos.....	79
4- Discussão.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

RESUMO

RESUMO

O transtorno do pânico (TP) é um quadro de ansiedade relativamente comum, com prevalência estimada entre 1% e 3%. O sintoma principal é o ataque de pânico (AP) espontâneo, o qual pode ocorrer várias vezes ao dia ou somente algumas vezes ao ano. Dentre as principais hipóteses sobre as bases neurais do TP, duas merecem destaque. A primeira, proposta por Deakin & Graeff (1991), postula que o sistema serotoninérgico evoluiu como um sistema especializado de controle de situações aversivas. Adicionalmente, postula que a matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) é um centro de coordenação de reflexos defensivos a predadores ou estímulos nocivos proximais, cuja a ativação espontânea desencadeia os AP. A segunda é a hipótese do “alarme falso de sufocamento” proposta por Klein (1993). De acordo com esta hipótese AP tanto espontâneos quanto provocados por infusão de lactato ou inalação de concentrações baixas de CO₂ (5-7%) são causados por disparos inadequados de um hipotético sistema de alarme de sufocamento. Estas hipóteses são apoiadas por evidências epidemiológicas que sugerem a existência de AP tanto respiratórios quanto não-respiratórios. Por outro lado, vários estudos indicam que eventos traumáticos na infância predispoem o indivíduo ao desenvolvimento de transtornos ansiosos e depressivos na vida adulta e, em particular ao TP. Portanto, o presente estudo comparou os sistemas neurais ativados nos modelos de pânico respiratório e não-respiratório à administração de KCN e exposição ao gato, respectivamente. Adicionalmente, verificamos os efeitos do isolamento neonatal social (INS) sobre os comportamentos e sistemas ativados em ratos adultos expostos a um gato. Num primeiro estudo, examinamos se o INS aumenta a imunorreatividade da proteína c-Fos (IRF) e

os comportamentos de defesa de ratos expostos ao gato na vida adulta. No segundo estudo, examinamos os efeitos de uma dose baixa de cianeto de potássio (KCN, 40 µg) ou de uma breve exposição a 13% de CO₂ (2 min), ou a combinação dos estímulos (CO₂/KCN), na IRF. Os efeitos comportamentais da microinjeção de KCN na MCPA também foram examinados. Os dados mostraram que tanto ratos submetidos ao INS, quanto ratos CTR expostos ao gato apresentam respostas inatas de congelamento, esquiva e avaliação de risco. Além disso, os ratos apresentam aumentos significantes da IRF em áreas tradicionalmente relacionadas à defesa de predadores, quais sejam, MCPA dorso lateral, núcleo pré-mamilar dorsal e hipotálamo anterior. Contudo, os ratos INS apresentaram IRF mais acentuada que os CTR. Estes dados sugerem que o INS promove uma sensibilização perene da circuitaria relacionada à predação, adicionando evidências de que o estresse de separação na infância predispõe o indivíduo ao desenvolvimento de AP na vida adulta. Os resultados do segundo estudo mostraram que, enquanto a injeção endovenosa de KCN provocou a fuga em todos os ratos testados, a microinjeção de KCN na MCPA foi ineficaz. Adicionalmente, enquanto o núcleo do trato solitário foi ativado nos grupos CO₂/SAL e CO₂/KCN, o núcleo laterodorsal tegmental (LDTg) foi ativado por todos os tratamentos. Surpreendentemente, o KCN somente produziu ativações da MCPA rostralateral e caudoventrolateral. Embora estes dados sugiram que o sistema de alarme de sufocamento seja composto pelo LDTg e pelas regiões rostralateral e caudoventrolateral da MCPA, as últimas áreas foram especificamente ativadas nos ratos que apresentam respostas de fuga

somente ao KCN. Portanto, elas são as principais candidatas ao sistema de alarme de sufocamento.

Palavras chaves: Matéria cinzenta periaquedutal, Imunoreatividade, c-Fos, Pânico, Fobia, Alarme de sufocamento, Exposição ao gato, Ansiedade de Separação, Estresse na Infância.

ABSTRACT

ABSTRACT

The panic disorder (PD) is a anxiety disorders relatively common, with a prevalence estimated between 1% and 3%. The main symptom is panic attack (PA) spontaneous, which can occur several times a day or only a few times per year. Of the main hypotheses about the neural basis of PD, two are worth mentioning. The first, proposed by Deakin & Graeff (1991), postulates that the serotonergic system evolved as a specialized aversive situations control system. Additionally, it postulates that the periaqueductal gray matter (PAG) is a center of coordination of defensive reflexes to predators or proximal noxious stimuli, whose spontaneous activation triggers the AP. The second is the hypothesis of "false alarm suffocation" proposed by Klein (1993). According to this hypothesis AP as either spontaneous caused by lactate infusion or inhalation lower CO₂ concentrations (5-7%) are caused by improper firing of a hypothetical suffocation alarm system. These hypotheses are supported by epidemiological evidence to suggest the existence of AP both respiratory and non-respiratory. On the other hand, several studies indicate that traumatic events in childhood predispose the individual to the development of anxiety and depressive disorders in adulthood, particularly of PA. Therefore, the present study compared the neural systems activated in both respiratory and non-respiratory models panic to administration of KCN and exposure to cat, respectively. Additionally, checking the effects of neonatal social isolation (NSI) we saw it on the behaviors and systems activated in adult rats exposed to a cat. In a first study, we examined whether NSI increases the Fos-like immunoreactivity (FLI) and the behaviors of defense rats exposed to cat in adulthood. The second study, examined the effects of a low dose of potassium

cyanide (KCN, 40 µg) or brief exposure to 13% CO₂ (2 min), or combination of stimuli (CO₂ / KCN), in the FLI. The behavioral effects of microinjection of KCN into the PAG were also examined. Data showed that both submitted to NSI and CTR rats showed innate fear responses, such as freezing, avoidance and risk assessment behaviors. In addition, the groups show significant increases in FLI in areas traditionally related to defense to predators, namely, MCPA dorsolateral, dorsal pre-mammillary nucleus and anterior hypothalamus. However, the INS rats showed IRF more pronounced than the CTR. The exposed to cat increased c-Fos density in defense related area (MCPAdl, PMd and AHN). The NSI group showed higher expression c-Fos in all area examined. Notably, data suggest that the NSI promotes a life-long facilitation of circuits activated by predator. These data suggest that the NSI promotes a perennial awareness related to predation circuitry, adding evidence that the separation stress in childhood predisposes the individual to the AP development in adulthood. The results of the second study showed that whereas the KCN injection elicited escape in all tested rats, the KCN microinjection into the PAG was ineffective. Additionally, while the núcleo do trato solitário (NTS) was activated in group CO₂/SAL and CO₂/KCN the laterodorsal tegmental nucleus (LDTg) was activated by all treatments. Surprisingly, the KCN only produced activations rostralateral and caudoventrolateral PAG (Although these data suggest that suffocation alarm system is composed by LDTg and the rostralateral and caudoventrolateral regions of the PAG, the latter areas are specifically activated in rats that have escape responses only to KCN. Therefore, they are prime candidates to suffocation alarm system.

Key words: periaqueductal gray matter, immunoreactivity, c-Fos, panic Attack, phobia, suffocation alarm system, exposure to a cat, separation anxiety in childhood, separation stress in childhood.

INTRODUÇÃO

1- HIPÓTESES DO TRANSTORNO DE PÂNICO

O transtorno do pânico (TP) é um quadro de ansiedade relativamente comum, com prevalência estimada entre 1% e 3% (Kaufman and Charney, 2000). O sintoma principal desta condição é o ataque de pânico (AP) espontâneo, que pode ocorrer várias vezes ao dia ou somente algumas vezes ao ano (Mezzasalma et al., 2004; APA, 2014). Os AP são definidos no DSM-V (APA, 2014) como um período limitado de desconforto ou medo intenso acompanhados por pelo menos 4 dos seguintes sintomas: palpitações, tremores, suores, aumento da frequência respiratória, sensação de sufocamento, medo de morrer e medo de perder a razão. Contudo, Klein (1993 a, b) sugere que a marcha dos sintomas do pânico clínico seja dispnéia, pânico, desejo de fuga e hiperventilação.

Atualmente, o TP é considerado como uma síndrome distinta tanto do transtorno de ansiedade generalizada (TAG) quanto dos outros transtornos de ansiedade (APA, 2014). Pacientes com TP também se queixam frequentemente de “ansiedade antecipatória”, isto é, do medo antecipado de desamparo na eventualidade de um AP, uma condição que pode agravar-se em “agorafobia” incapacitante. Adicionalmente, os AP apresentam alta comorbidade com depressão e, frequentemente, ansiedade de separação da infância (ASI), estados relacionados à sensação de desamparo e, indiretamente, à agorafobia (Cassano et al., 1989; Klein, 1993 a, b; Gorman, 1996; Gorman e Coplan, 1996; Johnson e Lydiard, 1998; Ballenger, 1998; Dunner, 1998, 2001; Kaufman e Charney, 2000).

Dentre as hipóteses existentes sobre as bases neurais do TP, duas merecem destaque. A primeira foi proposta por Deakin & Graeff (1991) e

baseia-se na prescrição dos inibidores de recaptura da serotonina (5-HT) para uma ampla gama de transtornos psiquiátricos, incluindo o TAG, o TP, o transtorno obsessivo compulsivo (TOC) e a depressão. Em vista deste fato, a hipótese de Deaking & Graeff (HDG) postula que o sistema serotoninérgico evoluiu como um sistema especializado no controle de situações aversivas. Segundo a HDG, a matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) seria um centro de coordenação de reflexos defensivos a predadores ou outros estímulos nocivos, como dor ou asfixia. Consequentemente, esta teoria sugere que os AP sejam estados similares ao medo a uma ameaça próxima, tal como na reação da presa face ao predador. Em particular, a HDG propõe que as projeções serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe (NDR) facilitam a ansiedade na amígdala, mas inibem o pânico na MCPA. A HDG propõe ainda que a depressão decorre da disfunção de um “sistema de resiliência comportamental” composto pelas projeções serotoninérgicas do núcleo mediano da rafe (NMnR) ao hipocampo. Este sistema teria a função de separar os eventos aversivos das tarefas cotidianas. A subregulação dos receptores $5HT_{1A}$ do hipocampo, pelos níveis elevados de corticosteróides das situações do estresse, conduziria o indivíduo à depressão. A segunda hipótese foi proposta por Klein (1993 a, b) e baseia-se nos sintomas respiratórios acentuados e na sensibilidade exagerada e específica dos pacientes de pânico aos metabólitos respiratórios, dióxido de carbono (CO_2) e lactato. A hipótese do “alarme falso de sufocamento” (AFS) postula que os AP espontâneos ou provocados por infusão de lactato ou inalação de concentrações baixas de CO_2 (5-7%) são causados por disparos inadequados de um sistema de alarme de sufocamento.

Devido à alta comorbidade dos AP com ASI, Preter e Klein (2008) propuseram que o elo comum entre estes transtornos seja um mecanismo opióide endógeno envolvido em ambos os transtornos. De fato, os opióides estão envolvidos tanto nas relações parentais (Panksepp et al., 1980; Kalin et al., 1995) quanto na respiração (Lawson et al., 1979; van der Schier et al., 2014)

Não obstante, os AP também tem sido relacionados a estruturas que não estão envolvidas no controle respiratório. Assim, Shekhar e colaboradores (1996) apresentaram evidências que o hipotálamo dorsomedial (HDM) seja o responsável pelo desencadeamento dos AP ao lactato. Em particular mostraram que, a depleção gabaérgica do HDM por infusão crônica de alilglicina torna os ratos suscetíveis à AP ao lactato. Contudo esta hipótese foi baseada em modelos comportamentais do TAG (teste de interação social, teste de conflito) que do TP.

2- PÂNICO E ANSIEDADE DE SEPARAÇÃO NA INFÂNCIA

Inúmeras evidências indicam a correlação entre eventos traumáticos da infância e anormalidades comportamentais e neuroendócrinas na vida adulta (Klein, 1964; R.G. Klein, 1995, Robson-Nay et al., 2012; Kendler et al., 1992). Crianças que sofreram abusos físicos ou que foram negligenciadas pelos pais, ou ainda, que vivenciaram experiências de divórcio ou privação dos cuidados maternos, podem tornar-se mais susceptíveis às psicopatologias (Bowlby, 1983; Manicavasagar et al., 1998; Rinne et al., 2000; Heim e Nemeroff, 2001; Teicher et al., 2003; Preter e Klein, 2008).

Segundo a teoria do apego de Bowlby (1983) o relacionamento afetivo da mãe, ou figura-materna, na primeira infância (1 a 3 anos) favorece o desenvolvimento de uma personalidade saudável. A ausência destes cuidados

resultaria em ASI e no desenvolvimento de apego ansioso (anxious attachment) e “personalidade insegura” no adulto (Ainsworth e Bowlby, 1991; Bowlby, 1983; Bretherton, 1992). Segundo Bowlby, o estresse na infância também predispõe no indivíduo o desenvolvimento de fobia, pânico e depressão.

A ASI é um transtorno no qual a separação da criança da figura de apego, geralmente a mãe, é acompanhada de ansiedade excessiva (APA, 2014). Klein (1980) descreve a ASI como um conjunto de sintomas e comportamentos de ansiedade que refletem a ativação de um sistema neurofisiológico de alarme que protege o jovem de rupturas reais, ou potenciais, dos laços familiares. Vários estudos sugerem que a ASI apresenta alta comorbidade com o TP em adultos (Klein, 1980; Klein RG, 1995). Mais notavelmente, existem vários estudos que sugerem que o estresse na infância e a ASI predispõem o indivíduo o desenvolvimento do TP (Tweed et al., 1989; Stein et al., 1996; Klein, 1964, 1993; Klein, 1995; Kossowsky et al., 2013; Preter and Klein, 2008, 2014; Battaglia et al., 2014).

Estudos epidemiológicos, por outro lado, sugerem que o pânico seja influenciado por genes e pelo meio ambiente. De fato, filhos de pais com TP apresentam respostas ventilatórias à hipercapnia semelhantes àqueles dos pacientes com pânico (Roberson-Nay et al., 2010). Adicionalmente, estudos epidemiológicos com gêmeos mostraram que um conjunto único de genes que predispõe tanto à ASI quanto ao TP (Battaglia et al., 1995; Roberson-Nay et al., 2012a). Segundo Roberson-Nay (2012a) estes genes são responsáveis por 60% e 38% dos casos de ASI e TP, respectivamente. Surpreendentemente, no entanto, estes autores sugerem que enquanto o ambiente infantil seja

responsável por 40 % dos casos de ASI, ele determina apenas 1,2% dos TP na vida adulta. Em contraste, o ambiente adulto (estresse) contribuiria para 60% dos casos de TP. Por sua vez, Rachel G. Klein (1995) mostrou que o aumento da frequência de AP e de internações devidas a episódios depressivos foram os únicos achados significantes em adultos do único estudo controlado de *follow-up*, duplo-cego, com entrevistas clínicas de crianças que apresentavam ASI comprovada por grave “recusa escolar”.

Embora Preter e Klein (2008) sugiram que o sistema opioidérgico seja o elemento comum entre a ASI e o pânico respiratório, a maior ameaça a um filhote isolado é a predação. Se este for o caso, a ASI pode estar mais relacionada ao sistema de alarme a predadores que ao sistema de alarme de sufocamento pelos pânico não respiratório e respiratório, respectivamente.

3- PÂNICO E FOBIA

Fobias específicas são comumente classificadas como medos de altura, de dano corporal ou sangue, de espaços fechados e de pequenos animais, como aranhas ou cobras. Os diagnósticos clínicos são, no entanto, complicados devido à alta comorbidade dos transtornos de ansiedade e suas associações com depressão e doença física (Dunne, 2001; Garakani et al., 2003; Gorman, 1996; Kaufman et al., 2000; Noyes, 2001). Em particular, o TP é altamente comórbido com TAG, ASI e agorafobia (Biederman et al., 2001; Biederman et al., 2006; Bienvenu et al., 2006; Klein, 1993b; Noyes et al., 1992; Noyes, 2001; Preter e Klein, 2008).

Embora os AP sejam frequentemente igualados ao medo, a relação de pânico com fobias específicas permanece incerta. Assim, enquanto Vollebergh e colaboradores (2001) sugeriram que TP esteja relacionado com agorafobia,

fobia social e fobia simples, Goisman e colaboradores (1998) sugeriram que indivíduos com TP simples (sem agorafobia) têm menos fobia específica que indivíduos com outros diagnósticos de ansiedade. Em realidade, a fobia simples parece ser mais frequente em pacientes com TAG (Noyes et al., 1992; Noyes, 2001) e transtorno de estresse pós-traumático (Goisman et al., 1998). Consequentemente, Goisman e colaboradores (1998) propuseram que TP reflita algum tipo de resistência ao desenvolvimento de fobia. Estas observações estão de acordo com estudos que demonstram que, enquanto o TP é altamente comórbido com agorafobia, a fobia simples é mais frequente no TAG, TOC, fobia social ou depressão maior (Nashold, 1969; Noyes et al., 1992; Noyes, 2001). Por outro lado, enquanto Segui e colaboradores (1999, 2001) sugeriram que fobia simples está associado ao TP tardio, Goodwin e colaboradores (2001) relataram que TP tardio apresentam comorbidade com TOC e ASI, mas não com fobia social ou fobia simples. Por fim, estudos epidemiológicos mostraram que filhos de fóbicos à pequenos animais apresentam taxas altas de externalização de ansiedade, enquanto filhos de pacientes de TP têm taxas altas de internalização (Unnewehr et al., 1998).

A ausência de comorbidade entre pânico e fobia também está de acordo com o único estudo pré-clínico, em ratos, sobre comorbidade de pânico e fobia (Tannure e colaboradores 2008). Estes autores examinaram a suscetibilidade ao pânico experimental (estimulação da MCPA) de ratos com fobia ao experimentador (resistência a captura) secundária ao “abrasamento” (*kindling*) da amígdala. Os resultados mostraram que os ratos fóbicos são menos suscetíveis ao pânico experimental induzidos por estimulação elétrica da MCPA, isto é, apresenta elevação dos limiares. Estes resultados sugerem que

os ataques de pânico e crises fóbicas sejam mediados por mecanismos distintos.

4- IMUNOISTOQUÍMICA DO SUFOCAMENTO E DA PREDACÃO

4.1- Áreas cerebrais ativadas por hipóxia e hipercapnia

Estudos de imunorreatividade da proteína c-Fos (IRF) relatam a ativação de várias áreas tanto na hipóxia quanto na hipercapnia prolongadas (2 h). No bulbo, Berquin e colaboradores (2000) mostraram que a hipóxia (11% O₂) aumentou a IRF no núcleo do trato solitário (NTS) rostral e caudal e em neurônios parapiramidais da superfície ventral do bulbo (SVB). Adicionalmente, Teppema e colaboradores (1997) relataram que a exposição prolongada (3 h) à hipóxia (9% O₂) ativou os grupos ventrolaterais do bulbo, incluindo os núcleos adrenérgico C1 e noradrenérgico A1 (as células marcadas foram encontradas principalmente nos núcleos ventrolaterais rostral e caudal, mas nenhuma no núcleo paragigantocelular lateral). Notadamente, estruturas mesencefálicas que não fazem parte dos núcleos respiratórios clássicos mostraram aumentos significantes de IRF. Particularmente, Berquin e colaboradores (2000) relataram que tanto a MCPA dorsolateral (MCPAdl) quanto, principalmente, a MCPA ventrolateral (MCPAvl), bem como o locus cerúleo (LC) e núcleo subcerúleo, foram ativados pela hipóxia (11%) e pela hipercapnia (5%). Contudo, o aumento no número de células marcadas na MCPAdl dos ratos hipóxicos ($\Delta = 97\%$) não foi estatisticamente significativo (Berquin et al., 2000). Rostralmente, Berquin e colaboradores (2000) encontraram aumentos significantes de IRF nos núcleos paraventricular, supraóptico e dorsomedial do hipotálamo, bem como no hipotálamo posterior e numa área ventrolateral que se estendia dos núcleos mamilares até a área retroquiasmática (zona

hipotalâmica ventral). Embora robustos, os aumentos de IRF do núcleo paraventricular de ratos hipóxicos (184%) e do núcleo supraóptico de ratos hipercápnicos (460%) não alcançaram significância estatística.

Enquanto as ativações dos núcleos hipotalâmicos paraventricular, supraóptico e dorsomedial estão aparentemente envolvidas nas respostas do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal ao CO₂ (Raff et al., 1983, 1984; Kaye et al., 2004), a ativação do hipotálamo posterior é particularmente importante na medida que ele abriga neurônios sensíveis tanto à hipóxia quanto à hipercapnia que se projetam à MCPA (Ryan e Waldrop, 1995). Em particular, os últimos autores sugeriram que a MCPA e a área parabraquial (APB) devem ser os relés fundamentais entre o hipotálamo posterior e os neurônios bulbares envolvidos nas respostas ventilatórias à hipóxia e a hipercapnia. É importante enfatizar, que as áreas ativadas pela hipóxia e pela hipercapnia foram similares em gatos (Larnicol et al., 1994), que têm hábitos exclusivamente 'aeróbicos', e em ratos (Berquin et al., 2000) que têm hábitos subterrâneos, e presumivelmente, alta tolerância ao CO₂. Em realidade, as espécies somente diferiram na ausência da expressão de c-Fos no núcleo retrotrapezóide dos ratos hipóxicos.

Por outro lado, Hayward e colaboradores (2002) mostraram que a estimulação dos quimiorreceptores carotídeos pelo cianeto de potássio (KCN) induziu a expressão de proteína c-Fos em toda extensão das colunas dorsais da MCPA. Este padrão é similar àquele da hipóxia ambiental (Berquin et al., 2000). Como Hayward e colaboradores (2002) conduziram seus experimentos em ratos anestesiados com uretana, as ativações não podem ser imputados nem às respostas emocionais, nem às respostas motoras. Conclui-se, portanto,

que elas foram devidas à projeções do NTS às regiões dorsais da MCPA (MCPD). Adicionalmente, Hayward e colaboradores (2002) mostraram que menos de 10% dos neurônios na MCPA enviam projeções à região A5 que é o suposto efector do componente pressor do quimiorreflexo (Guyenet e Koshiya, 1995). Portanto, as ativações da MCPD não podem ser atribuídas à ativação do quimiorreflexo. Estes resultados apoiam estudos anteriores, que mostram tanto a facilitação da “falsa ira” pela administração de KCN (Bizzi et al., 1961); quanto a facilitação das respostas ventilatórias do quimiorreflexo pela estimulação das áreas de defesa (Hilton e Joels, 1965). Os trabalhos de Hayward e colaboradores (2002) também são consoantes com a elicitação de respostas transientes de fuga pela estimulação seletiva dos quimiorreceptores carotídeos por dose subletais de KCN (30-90 μg iv) (Franchini e Krieger, 1993). Adicionalmente, estudos recentes de Schimitel e colaboradores (2012, 2014) também estão de acordo com os trabalhos de Hayward e colaboradores (2002). Schimitel e colaboradores (2012, 2014) observaram que a administração endovenosa de KCN produz comportamentos de fuga, que são facilitados por hipercapnia (8% e 13%), bloqueados por lesões eletrolíticas da MCPD e atenuados por tratamentos com pânicolíticos clinicamente eficazes. Contudo, a localização precisa do sistema de alarme de sufocamento na MCPA foi gravemente comprometida pela inespecificidade tanto das lesões eletrolíticas (Schimitel et al., 2012) quanto das administrações repetitivas de doses elevadas de KCN (> 60 μg) em ratos anestesiados.

4.2- Áreas cerebrais ativadas pela exposição de roedores ao predador ou ao seu odor

Estudos de IRF mostraram a ativação de diversas áreas em roedores expostos ao predador ou ao seu odor. Canteras e colaboradores (1997, 1999) mostraram um aumento de IRF na área pré-óptica (APO) medial, porém uma marcação reduzida nas áreas anterodorsal e anteroventral da APO. Ao nível do hipotálamo anterior observaram intensa marcação do hipotálamo anterior (HA), área retroquiasmática e partes adjacentes à região perifornical da área hipotalâmica lateral. Porém, não houve marcação significativa nem na área hipotalâmica lateral e nem no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Na região tuberal, foi observada uma marcação robusta na parte dorsomedial do hipotálamo ventromedial (HVMdm), bem como, em menor grau, no HDM e na região intermediária entre o hipotálamo ventromedial e HDM. Uma das áreas mais densamente marcadas foi o núcleo pré-mamilar dorsal (PMd). Também foram encontrados aumentos moderados de IRF no núcleo hipotalâmico posterior. No córtex foram observados aumentos significantes de IRF nas áreas infralímbica, pré-límbica, cíngulo anterior, área motora secundária, área retrosplenial agranular e áreas temporais ventral e auditiva. Na região septal, foram observados aumentos de IRF nos núcleos septofimbrial e lateral rostral, bem como nos núcleos interfascicular e transverso e núcleo interticial da estria terminal (NIET). Na região talâmica, foram observados marcações nos núcleos paraventricular, intralaminar, anteromedial ventral e na habênula lateral. No tronco encefálico foram observadas marcações na MCPAdl rostral e MCPAvl caudal, nas camadas intermediárias do colículo superior, no núcleo cuneiforme medial (CnF), núcleo laterodorsal tegmental (LDTg) e no NDR. A exposição de

roedores ao gato também promove aumentos de marcação c-Fos de várias regiões distintas da amígdala (Martinez et al., 2011), como em toda a amígdala medial (AMe), com destaque para a parte postero-ventral, parte posterior da amígdala basomedial e amígdala lateral. Em contraste, não foram observadas ativações significativas da amígdala basolateral anterior e da amígdala central lateral.

A exposição de ratos ao odor de gato produz ativações de diversas áreas que também são marcadas na exposição ao gato (Dielenberg et al., 2001). O odor do gato produziu marcação acentuada nas áreas do hipotálamo medial, no HVMdm, no PMd, na MCPAdl e MCPAvl. Também foi observada densidade moderada de neurônios marcados no NIET, no HA, na parte posteroventral da AMe e na MCPA dorsomedial (MCPAdm). Densidades menores de marcação c-Fos foram observadas nas áreas medial e lateral da APO, no PVN e no CnF.

5- MODELOS ANIMAIS DE PÂNICO

Pacientes de TP apresentam sensibilidade exagerada e específica à inalação de 5-7% de CO₂ e à infusão de lactato de sódio 0,5 M. Outra característica do pânico clínico é a ausência de secreção dos hormônios do estresse como corticotrofina, cortisol e prolactina. O TP também é mais frequente em mulheres e tem alta comorbidade com ASI, transtorno disfórico do período lúteo tardio (antiga tensão pré-menstrual) e depressão. O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é, no entanto, ativado em pânicos similares ao medo marcados por palpitações, tremores e sudorese, mas desprovidos de sintomas respiratórios. Estes e outros dados sugerem a existência de AP tanto respiratórios quanto não-respiratórios (Roberson-Nay et al., 2012b). A

elucidação dos mecanismos neurais do pânico é um forte ensejo para o desenvolvimento de modelos experimentais deste transtorno.

5.1- Pânico não-respiratório por exposição ao predador

Vários estudos utilizam a exposição de roedores a um predador natural, geralmente, um gato. Ratos expostos ao gato apresentam comportamentos defensivos de fuga, imobilidade tensa ou congelamento (*freezing*), esquiva, comportamentos de avaliação de risco, ativação autonômica e ataques defensivos (Blanchard et al., 1989a, Canteras 1997; 1999; Dielenberg et al., 2001). Adicionalmente, o padrão destes comportamentos varia conforme a distância do predador e/ou da viabilidade de fuga (Blanchard et al., 1989a).

Para Blanchard (1989a), ameaças potenciais, tais como o odor do predador, produzem comportamentos defensivos diferentes daqueles observados na presença do predador (ameça iminente). Ao invés dos comportamentos de fuga e congelamento, as ameaças potenciais produzem comportamentos de avaliação de risco, incluindo alongamentos atentos ou investigativos de ameaça (*stretch attend* e *stretch approach*). Aparentemente, a avaliação de risco é um componente atenuado de defesa à uma ameaça iminente. Assim, quando a avaliação de risco produz informações que confirmam ou localizam a ameaça, o animal pode mudar o padrão de resposta de comportamentos “ansiosos” para comportamentos mais intensos de “medo”. Contrariamente, quando o perigo não pode ser localizado ou confirmado, o comportamento de avaliação de risco pode continuar por longos períodos ou desaparecer por completo.

Blanchard e colaboradores (1999) conduziram vários estudos de exposição de roedores ao predador usando um sistema de toca visível (visible

burrow system) Neste modelo, os ratos são alojados em um conjunto de túneis e câmaras transparentes semelhantes à tocas naturais, com água e comida à vontade, que se abrem a um pátio onde os ratos podem ser expostos a um gato. Neste modelo, ratos selvagens tratados com diazepam (2 e 4 mg/kg, i.p.) e clordiazepóxido (5 e 10 mg/kg) não apresentam alteração alguma nos comportamentos de fuga e congelamento, apoiando sua relação com o TP. Contudo, ratos de laboratório apresentam uma redução no comportamento de fuga e aumento da avaliação de risco, porém sem efeito algum na imobilidade (Blanchard et al., 1989b, 1998). Já em estudos com agonistas de receptores 5HT_{1A} como 8-OH-DPAT (0,01 e 1,0 mg/kg) e gepirona (5,0 e 10,0 mg/kg), ratos de laboratório apresentaram diminuição nos comportamentos de esquiva, imobilidade, autolimpeza e trânsito entre as áreas distantes e próximas ao gato (uma medida de avaliação de risco) (Blanchard et al., 1992, 1998; Shepherd et al., 1990; Eison et al., 1991). Estes dados farmacológicos juntos, sugerem especificidade das drogas ansiolíticas e serotoninérgicas nos comportamentos defensivos de ratos de expostos ao gato.

5.2- Pânico não-respiratório por estimulação elétrica da MCPA

As respostas à estimulação elétrica da MCPA têm sido propostas como um modelo válido de AP tanto em ratos como em humanos (Gentil, 1988; Deakin e Graeff, 1991; Jenck et al., 1995; Schenberg et al., 2001; Nashold et al., 1969). De fato, Nashold e colaboradores (1969) mostraram que a estimulação intracraniana da MCPA de humanos produz ansiedade, pânico, terror e sentimentos de morte iminente acompanhados por sinais neurológicos e respostas viscerais que reproduzem os sintomas cardinais dos AP. A

localização dos eletrodos por raio-X mostrou que os sítios eficazes encontravam-se na metade dorsal da MCPA (MCPD).

Em ratos, a estimulação da MCPD com estímulos de baixa magnitude produz uma reação de imobilidade tensa e exoftalmia. Em contraste, estímulos mais intensos produzem comportamentos de fuga, compreendendo trotes, galopes e saltos (Bittencourt et al., 2004; Schenberg et al., 2005). Notavelmente, a resposta de galope foi seletivamente atenuada pela administração crônica de antidepressivos em doses e regime de administração similares aos empregadas na terapia do TP (Schenberg et al., 2001, 2002; Vargas e Schenberg, 2001). Conseqüentemente, o galope tem sido sugerido como a resposta mais representativa dos AP (Schenberg et al., 2001). É igualmente notável que estimulações da MCPD que produziram fuga numa arena de 60 cm de diâmetro não tiveram efeito algum sobre a secreção dos "hormônios do estresse" corticotropina, corticosterona e prolactina quando os ratos foram estimulados num cilindro com 20 cm de diâmetro que inibiu a resposta de fuga (Armini et al, 2015). Os últimos dados reproduzem a ausência de secreção dos hormônios do estresse no pânico clínico (Liebowitz et al, 1985; Levin et al, 1987; Sinha et al, 1999).

5.3- Pânico respiratório por administração endovenoso de KCN

Franchini e Krieger (1993) mostraram que a estimulação seletiva dos quimiorreceptores carotídeos com doses subletais de KCN (30-90 µg i.v.) produz comportamentos de defesa em ratos. O envolvimento dos quimiorreceptores arteriais na resposta ao KCN foi claramente demonstrado pela ausência das respostas respiratórias induzidas pelo KCN em ratos com

desnervação sinusal. Os autores também mencionam que a desnervação aboliu os efeitos comportamentais.

Neste sentido, vários estudos sugerem que as respostas de fuga à estimulação seletiva dos quimiorreceptores por baixas doses de KCN seja um modelo respiratório de pânico (Schimitel et al., 2012, Schimitel et al., 2014, Schenberg et al., 2014). Em particular, Schimitel e colaboradores (2012) examinaram os efeitos comportamentais da hipercapnia (8% e 13% de CO₂) e da estimulação dos quimiorreceptores carotídeos (10-80 µg KCN, i.v.), tanto isolados como combinados, em controles e ratos estimulados ou lesionados na MCPD. Estes estudos mostraram que a exposição dos ratos ao CO₂ (13%) não produziu comportamentos manifestos de defesa a despeito do aumento visível da atividade respiratória. Contudo, enquanto a exoftalmia (abertura completa dos olhos) foi aumentada, a autolimpeza foi reduzida. As últimas respostas sugerem o aumento da atenção aos estímulos ambientais. Inesperadamente, ratos expostos a misturas hipercápnicas (8% e 13%) apresentaram atenuações significantes das respostas de congelamento (exoftalmia e imobilidade) e fuga (trote, galope) à estimulação elétrica da MCPD. A administração endovenosa de KCN produziu resultados opostos. De fato, enquanto a administração isolada de KCN eliciu respostas de fuga, a resposta de fuga ao KCN foi potenciada pela pré-exposição ao CO₂ (8% e 13%). Adicionalmente, a infusão de uma dose subliminar de KCN (20 µg/30s) facilitou as respostas de fuga à estimulação elétrica da MCPD (Schimitel et al., 2012). Notavelmente, as respostas de fuga produzidas pela administração de KCN foram abolidas tanto por lesões eletrolíticas restritas da MCPD, como pelo tratamento agudo e crônico com pânicolíticos clinicamente efetivos (clonazepam 0.01–0.3 mg/kg,

i.p. e fluoxetina 1–4 mg/kg/dia/21 dia, i.p., respectivamente) (Schimittel et al., 2014). Os resultados de Schimittel e colaboradores (2012, 2014) sugerem que a MCPA abriga um sistema de alarme de sufocamento sensível à hipóxia, cuja a ativação precipita ataques de pânico e potencializa as respostas a hipercapnia. A atenuação das respostas ao KCN por tratamento clinicamente eficaz com pânicolíticos, acrescenta novas provas para a teoria do alarme falso de sufocamento do transtorno do pânico.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Comparar os sistemas neurais ativados nos modelos de pânico respiratório e não respiratório à administração de KCN e exposição ao gato, respectivamente e verificar o efeito do isolamento social neonatal sobre os comportamentos de defesa e ativações neurais de ratos adultos expostos a um gato.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar a expressão da proteína c-Fos na MCPA de ratos não anestesiados expostos a hipercapnia (CO₂ 13 %) ou administrados com uma dose baixa (40 µg) de KCN, ou expostos a ambos os estímulos.
2. Verificar a expressão da proteína c-Fos na MCPA e em outras áreas de defesa tanto em controles como em ratos submetidos ao isolamento social neonatal e expostos a um gato quando adultos;

ESTUDOS

ESTUDO I:

**À BEIRA DE UM ATAQUE DE PÂNICO DO TIPO RESPIRATÓRIO:
ATIVAÇÃO SELETIVA DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL,
NÚCLEO TEGMENTAL LATERODORSAL E DO NÚCLEO DO TRATO
SOLITÁRIO APÓS FUGA DE CURTA DURAÇÃO À DOSES BAIXAS DE
CIANETO DE POTÁSSIO**

RESUMO

Administração endovenosa de cianeto de potássio (KCN), produz fuga por si só como facilita a fuga por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA). Além disso, enquanto fuga produzido por KCN é potenciado por CO₂, esta fuga é suprimida tanto por lesões eletrolíticas da MCPA quanto por tratamento com panicolíticos clinicamente eficazes. Estes e outros dados sugerem que a MCPA abriga um sistema de alarme sensível à hipóxia, onde sua ativação poderia precipitar o pânico ou promover hipersensibilidade ao CO₂. Embora estudos anteriores de imunohistoquímica de proteína c-Fos relatam ativações generalizadas da MCPA após injeções KCN, o emprego de injeções repetidas de altas doses de KCN (> 60 µg) em ratos anestesiados compromete tanto a localização das áreas sensíveis ao estímulo, como a sua correlação com o comportamento fuga. Desta forma, aqui foram examinados os efeitos de uma baixa dose de KCN (40 µg) ou de uma breve exposição à 13% de CO₂ (2 min), ou a combinação dos estímulos (CO₂/KCN), na expressão de c-Fos na MCPA, núcleo tegmental laterodorsal (LDTg), núcleo do trato solitário (NTS) e área parabraquial lateral (APBI) de ratos conscientes. Efeitos comportamentais de microinjeções de KCN na MCPA também foram avaliados. Os dados mostraram que, enquanto as injeções endovenosas de KCN provocaram fuga de curta duração em todos os ratos testados, as microinjeções de KCN na MCPA foram ineficazes. Além disso, embora somente a exposição de CO₂ tenha sido ineficaz, a pré-exposição ao CO₂ potenciou a fuga produzido por KCN. Comparado com os controles, o NTS foi ativado nos grupos CO₂/SAL e CO₂/KCN, ao passo que o APBI não foi ativado por qualquer tratamento. Por sua vez, ao passo que o LDTg foi ativado por

todos os tratamentos, a MCPA rostralateral e caudoventrolateral foram ativados somente por ar/KCN. Os dados sugerem que o sistema de alarme de sufocamento é composta pelo LDTg e pelas MCPA rostralateral e caudoventrolateral.

ABSTRACT

Intravenous injections of potassium cyanide (KCN) both elicit escape by its own and facilitate escape to electrical stimulations of the periaqueductal gray matter (PAG). Additionally, whereas the KCN-evoked escape is potentiated by CO₂, it is suppressed by both electrolytic lesions of PAG and clinically-effective treatments with panicolytics. These and other data suggest that the PAG harbors a hypoxia-sensitive alarm system which activation could either precipitate panic or render the subject hypersensitive to CO₂. Although prior c-Fos immunohistochemistry studies reported widespread activations of PAG following KCN injections, the employment of repeated injections of high doses of KCN (>60 µg) in anesthetized rats compromised both the localization of responsive areas and their correlation with behavior. Accordingly, here we examined the effects of either a low dose of KCN (40 µg) or a short exposure to 13% CO₂ (2 min), or a combined stimulus (CO₂/KCN), on c-fos expression of PAG, laterodorsal tegmental nucleus (LDTg), nucleus of tractus solitarius (NTS) and lateral parabrachial area (APBI) of conscious rats. Behavioral effects of KCN microinjections into the PAG were assessed as well. Data showed that whereas the KCN injections elicited short-lasting escape in all tested rats, KCN microinjections were ineffective. Moreover, although the CO₂ alone was ineffective, it potentiated the KCN-evoked escape. Compared to controls, the NTS was activated in CO₂/saline and CO₂/KCN groups, whereas the PBA was not activated by any treatment. In turn, whereas the LDTg was activated by all treatments, the rostralateral and caudoventrolateral PAG were activated by air/KCN only. Data suggest that the suffocation alarm system is made up by LDTg and both rostralateral and caudoventrolateral PAG.

1- INTRODUÇÃO

Evidências sugerem que a matéria cinzenta periaquedutal do mesencéfalo (MCPA) é composta de colunas funcionalmente especializadas que se estendem ao longo do aqueduto cerebral (Bandler e Depaulis, 1991; Bandler e Keay, 1996; Carrive, 1993; Keay e Bandler, 2004). Em particular, a divisão da MCPA em colunas dorsomedial (MCPAdm), dorsolateral (MCPAdl), lateral (MCPAl) e ventrolateral (MCPAvl) foi confirmada por estudos que comprovam uma organização colunar por conexões e composições de neurotransmissores (Smith et al, 1994; Keay e Bandler, 2004). As abundantes ligações intrínsecas da MCPA sugerem, por outro lado, que as colunas não são independentes (Jansen et al., 1998). De fato, há evidências de que os comportamentos defensivos de rato são controlados por atividades diferenciadas concentradas nas colunas dorsomedial, dorsolateral e laterais da MCPA, geralmente unificada e chamada de "MCPA dorsal" (MCPD) (Bittencourt et al, 2004; Keay e Bandler, 2004). Embora ainda não esteja bem esclarecido, as colunas da MCPA parecem apresentar especializações ao longo de seu comprimento. Por exemplo, o setor caudal da MCPAdl apresenta tanto alta densidade de substância P (Smith et al., 1994) quanto alta sensibilidade à agonistas de receptor do ácido N-metil-D-aspartico (Teixeira e Carobrez, 1999). Por sua vez, enquanto o MCPAl rostral (MCPAlr) recebe a maioria das projeções finas do tronco encefálico e do hipotálamo (Mota-Ortiz et al., 2009), a MCPAl caudal (MCPAlc) recebe projeções vindas do bulbo (Keay e Bandler, 2004). No entanto, Holstege e colaboradores (1997) mostraram que tanto MCPAlr como a MCPAlc enviam projeções densas para o núcleo retroambiguo (NRA), uma projeção mais caudal à MCPA.

Embora menos enfatizado, a MCPA também pode ser dividida quanto à densidade de células, que se apresenta com aumentos de concentração das regiões mais próximas ao aqueduto (justaqueductal), para as regiões medial e periférica (Keay e Bandler, 2004). Em particular, Ruiz-Torner e colaboradores (2001) associou a divisão colunar da MCPA com sua divisão radial ao fazer uma revisão baseada na imunoistoquímica das subdivisões tradicionais da MCPA. Além de corroborar à coloração específica da MCPAdl à NADPH diaforase (NADPHd) (Onstott et al., 1993), estes autores também mostraram que o MCPAl difere da MCPAvl, já que o primeiro é acentuadamente corado para acetilcolinesterase (AChE). Além disso, eles mostraram que os setores medial da MCPAl e da MCPAvl formam uma única entidade neuroquímica, aqui designada por MCPA central (MCPAce), que é marcada para tirosina hidroxilase (TH), serotonina (5-HT) e glutamato (GLU). Estudos anteriores já haviam demonstrado que a MCPAce apresenta alta sensibilidade à antagonistas GABA (Behbehani et al., 1990). Mais notavelmente, contudo, Ruiz-Torner e colaboradores (2001) propõem que a MCPAce expande caudalmente (-8 mm do bregma), ocupando o antigo território da MCPAl. Como resultado, a MCPAl é deslocada para cima para uma região dorsolateral vizinha ao restante da MCPAdl. A importância da MCPAce é ainda mais realçada pela sua coloração específica tanto para os endomorfina (EDM) como para a colecistoquinina (CCK) (Smith et al, 1994; Lv et al., 2010). Mais importante, no entanto, a MCPAce e a MCPAvl são as únicas regiões da MCPA que supostamente recebem aferências do núcleo do trato solitário (NTS) (Bandler e Tork, 1987; Lv et al, 2010).

Por outro lado, estimulações elétricas e químicas da MCPD evocam emoções aversivas em humanos e respostas defensivas e autonômicas em animais que fazem lembrar ataques de pânico (Deakin e Graeff, 1991; Jencks et al, 1995;. Schenberg, 2010; Schenberg et al ., 2001, 2014; Canteras e Graeff, 2014). Em particular, os estímulos da MCPD de seres humanos produzem pânico, desconforto intenso, desejo de escapar, dispnéia, dor torácica e sensação de asfixia ou "fome de ar" que são típicos de pânico clínico (Nashold et al., 1969; Amano et al., 1978; Kumar et al., 1997). A MCPD também é ativada em voluntários que experimentam sintomas claros de sufocamento (Brannan et al., 2001) ou em voluntários que fogem de um predador virtual capaz de promover choques reais em seus dedos (Mobbs et al., 2007). Estudos epidemiológicos mostraram, por outro lado, que o pânico pode ser respiratório ou não-respiratório, dependendo da proeminência dos sintomas respiratórios (Roberson-Nay e Kendler, 2011). Por conseguinte, a MCPD tem sido proposta como a melhor candidata para mediar a ambos os tipos de pânico (Schenberg, 2010;. Schenberg et al., 2014; Schmitel et al., 2012).

Em animais, estimulações elétricas e químicas da MCPD produz imobilidade ('freezing') e/ou comportamentos de fuga juntamente com acentuadas respostas cardiorrespiratórias (Bandler e Depaulis, 1991; Schenberg et al, 1993, 2005;. Schenberg e Lovick, 1995; Bittencourt et al., 2004; Subramanian et al, 2008;. Subramanian e Holstege, 2013). Mais notavelmente, comportamentos defensivos evocadas pela MCPD foram acentuadamente atenuados pelas administrações por 21 dias de panicolíticos em doses iguais às utilizadas na terapia de TP (Schenberg et al., 2001).

Notavelmente, também, estimulações da MCPD que produziram fuga num campo aberto de 60 cm de diâmetro falharam no aumento nos "hormônios do estresse" corticotropina, corticosterona e de prolactina quando estes mesmos ratos foram estimulados de um cilindro com diâmetro de 20 cm que inibiu a fuga (Armini et al., 2015). Os últimos dados reproduzem a falta de respostas hormonais de estresse que é uma marca do pânico clínico (Liebowitz et al., 1985; Levin et al, 1987; Sinha et al, 1999). Notavelmente, assim, Schimitel e colaboradores (2012) apresentaram evidências convincentes de que a MCPD abriga um sistema de alarme sensível a hipóxia que pode ser implicado em ataques de pânico do tipo respiratório. Em particular, ao passo que as lesões electrolíticas da MCPD suprimiram os comportamentos defensivos produzidos por injeções intravenosas de doses baixas (20-60 µg) de cianeto de potássio (KCN), as respostas defensivas a estímulos elétricos da MCPD foram facilitados pela perfusão concomitante de um dose subliminar de KCN (20 µg/30 s). Além disso, a fuga produzida por KCN foi acentuadamente facilitada pela exposição prévia dióxido de carbono (CO₂; 8% e 13%). Como as exposições de CO₂ por si só não produziram fuga, Schimitel e colaboradores (2012) propuseram que a MCPD abriga um sistema de alarme de sufocamento sensível à hipóxia que tem sua ativação precipitada tanto por um ataque de pânico do tipo respiratório como por hipersensibilidade ao CO₂. Finalmente, estudos recentes mostraram que pânico evocado por KCN e hipóxia são atenuadas tanto por tratamentos clinicamente eficazes com panicolíticos (Schimitel et al 2014; Spiacci et al., 2015) como por injeções intraperiaquedutal de agonistas de receptor 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} (Spiacci et al., 2015). Esses estudos estão em consonância com a teoria do falso alarme de

sufocamento dos ataques de pânico (Klein, 1993a, b; Preter e Klein, 2008, 2014).

Embora Schimitel e colaboradores (2012) tenham sugerido que o pânico respiratório (suffocamento) e o pânico não respiratórios (reação de defesa) são processados na MCPAI e MCPAdl, respectivamente, a falta de especificidade das lesões electrolíticas comprometeu a localização dos sítios reativos ao KCN. A identificação dos sítios de resposta ao KCN também foi comprometido em estudos de imunoistoquímica da proteína c-Fos que empregaram injeções repetidas de doses elevadas ($> 60 \mu\text{g}$) de KCN em ratos anestesiados com uretana (Hayward e Von Reizenstein, 2002). Por outro lado, no entanto, os ratos que desenvolveram fuga para a hipóxia ambiental severa (6% de O_2) mostraram ativações selectivas somente da MCPAdl e MCPAI (Casanova et al., 2013). Como os neurônios da MCPA *in vitro* são intrinsecamente sensível à hipóxia (Kramer et al., 1999), não ficou claro se as ativações da MCPA do último estudo foi devido a ações periféricas ou centrais da hipóxia ambiental. Portanto, aqui nós examinamos a expressão da proteína c-Fos no tronco cerebral de ratos duas horas após a injeção intravenosa de uma dose baixa de KCN ($40 \mu\text{g}$), à uma exposição curta (2 min) à 13% de CO_2 ou aos dois estímulos combinados (CO_2/KCN). Os efeitos comportamentais de microinjeções de KCN na MCPD também foram avaliados.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Ratos Wistar machos adultos ($n = 70$), pesando entre 230 e 260 g, foram alojados em grupos de 4-5 ratos em gaiolas de polipropileno (60 cm x 50 cm x 22 cm) com assoalho de maravalha e comida e água *ad libitum*. As gaiolas foram mantidas em uma sala com temperatura controlada (20-25 ° C) e som atenuado (46 dB) sob um ciclo claro/escuro de 12 h ciclo (luzes acesas às 06:00). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento e o número de animais. Experimentos estavam em conformidade com o Guia de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde (NIH Publicações No. 80-23, 1996) e foram aprovados pelo comitê de ética sobre o uso dos animais na pesquisa científica da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES, 55 / 2013).

2.2. Canulação da veia jugular para a administração endovenosa de KCN.

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital de sódio (35 mg/kg, ip) e xilazina (8 mg/kg, i.p.) e então implantados com um cateter de silastic preenchido com heparina (1 mm de diâmetro externo) que foi inserido através da veia jugular direita. Após a implantação, o cateter foi conduzido por meio de um trocáter sob a pele para região dorsal e exposta ao nível da nuca. Após a sutura das incisões, os animais eram mantidos numa placa aquecida à 30°C até a recuperação da anestesia.

2.3. Quimitrodos

Os quimitrodos permitiram tanto as microinjeções de KCN, como a avaliação de eventuais efeitos citotóxicos produzidos pelo KCN por meio das

mudanças nos limiares de comportamentos defensivos produzidos pela estimulação elétrica da mesma área. Os quimitrodos eram constituídos por um arame de aço inoxidável (Califórnia Fine Wire Company, Grover, EUA) de 0,20 mm de diâmetro colada a uma guia-cânula de aço inoxidável não isolado (0,6 milímetros de diâmetro externo). Os eletrodos eram isolados em toda sua extensão, exceto no corte transversal da ponta. A fim de facilitar a implantação do quimitrodo, a cânula possuía um bisel que ficava 3 mm abaixo da ponta do eletrodo. O eletrodo e a cânula guia foram montados em um pedaço de soquete (BCPT; Cromatek, Guarulhos, Brasil). O cânula guia também serviu de eletrodo indiferente.

2.4. Implantação do quimitrodo

Os ratos ($n = 50$) foram tratados com diclofenaco de sódio (1 mg/kg, im) e ceftriaxona (30 mg/kg, im), anestesiados com pentobarbital de sódio (35 mg/kg, ip) e xilazina (8 mg / kg, i.p.) e fixados à um aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, EUA) com o plano horizontal do crânio entre bregma e lambda. Após a exposição do crânio, limpeza e anti-sepsia, 4 parafusos de aço inoxidável para ancoragem (3,5 mm x 1,35 mm) foram fixados nos ossos parietais e interparietal. O quimitrodo foi inserido através de um pequeno orifício de trepanação e uma incisão na dura-máter de acordo com as seguintes coordenadas do bregma: - 7,8 mm ântero-posterior, -2,1 mm lateral e -5 mm profundidade em um ângulo de 15°. Ao final da cirurgia, a área foi preenchida com resina dentária autopolimerizante e um estilete de aço inoxidável foi inserida na cânula guia, para evitar a sua obstrução. Por fim, os ratos foram colocados sobre uma plataforma aquecida (32 °C) até sua plena recuperação.

2.5. Administração de CO₂

A câmara de CO₂ de acrílico com 50 cm de altura e diâmetro situava em uma sala com temperatura controlada (22-25°C) e som atenuado. A câmara tinha uma tampa com selos de borracha nos rebordos superiores e inferiores e era ligada por uma válvula à um cilindro de CO₂. A tampa também tinha um ventilador de exaustão para a renovação do ar após exposições ao CO₂ e um ventilador no lado interno para assegurar a distribuição homogênea do CO₂. O chão da câmara foi dividido em 12 espaços de 164 cm², dos quais, 8 compunham um anel periférico e 4 uma zona central. O CO₂ era administrado a pressão de vapor ao longo de 30 s a uma taxa de 27 l/min. A câmara foi calibrada por meio de um kit de análise química CO₂/O₂ (Testoryt, Confor Instrumentos Confor, São Paulo, Brasil).

2.6. Protocolo Experimental

2.6.1. Administração endovenosa de KCN

No dia após a implantação dos cateteres intra-atrial, os ratos foram ligados a uma tubo de polietileno de 80 cm de comprimento (PE-10, Clay Adams, EUA) e colocados na câmara de gás. Após um período de habituação de 10 min, os ratos (n = 10) receberam uma injeção endovenosa em bolus (0,1 ml) de solução salina a 0,9% (controles) ou 40 µg de KCN (Cromoline, São Paulo, Brasil). Os outros dois grupos (n = 10) foram injetados com solução salina ou KCN imediatamente 30 s após o preenchimento da câmara com 13% de CO₂. Os comportamentos dos ratos foram filmados ao longo de 2 min após as injeções e medidos off-line.

2.6.2. Injeções intra-periaquedutal de KCN

As microinjeções de KCN foram realizadas com uma microseringa de 1 μ L (7001 KH, Hamilton, Reno, EUA) ligado a um tubo de polietileno (PE-10, Clay Adams, EUA) e uma agulha de injeção de 0,3 mm de diâmetro e 1mm de comprimento maior que a cânula guia. O KCN era injetado durante 1,5 minutos a uma taxa de 0,07 mL/min com a ajuda de uma bomba de infusão (Insight, Ribeirão Preto, Brasil). As doses intra-periaquedutal de KCN (12, 25, 50, 100, 150 e 200 pmol/100 nL, n = 5-10/grupo) foram com base na concentração máxima que poderia ser alcançada após a administração de 40 μ g KCN em um compartimento inteiramente permeável (isto é, 40 μ g/250 g ou, aproximadamente, 25 pmol/100 nL).

2.7. Efeitos das microinjeções de KCN sobre os comportamentos defensivos induzidos por estimulação elétrica

Para avaliar os eventuais efeitos citotóxicos das microinjeções de KCN, os limiares de comportamentos de fuga (trote, galope e/ou salto) induzidas por estimulação elétrica da MCPD foram avaliados 24 h antes, imediatamente após e 24 h após a microinjeção de KCN. No dia anterior à microinjeção de KCN, os ratos foram colocados num campo aberto e conectado a um estimulador de corrente constante senoidal (VDF, Ribeirão Preto, Brasil). Os ratos eram estimulados por 30 s por um pulso de onda senoidal (0-60 μ A, 60 Hz, corrente alternada) aplicado em intervalos de 5 min. A intensidade do pulso era aumentada ao passo de 5 μ A até a produção da fuga (trote, galope e/ou salto) ou até a intensidade de corte de 60 μ A. Estimulações com intensidades de

corrente acima do limiar de congelamento (imobilidade + exoftalmia) foram novamente aplicadas imediatamente após e 24 h após as microinjeções de KCN.

2.8. Imunoistoquímica c-Fos

Duas horas após a administração endovenosa de KCN, os ratos foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (130 mg/kg, ip) e perfundidos intracardial com o auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex C / G, modelo 77120-70, Barrington, EUA) com 300 ml de solução salina a 0,9%, seguida de 500 mL de paraformaldeído a 4% tamponados em tampão fosfato à 0,1 M (PBS, pH 7,4). A seguir, os cérebros foram removidos, pós-fixados por cerca de 3 h em fixador sacarose 30% e armazenada por no mínimo 7 dias em tampão de sacarose 30% à 4°C para crioproteção. Os cérebros foram seccionados num criostato (Leica CM 1850, Wetzlar, Alemanha). Quatro conjuntos de cortes coronais de 30 µm de espessura do tronco encefálico foram coletados em recipientes separados e armazenados em solução crioprotetora a -20°C. Destes, a primeira série foi processada para imunoistoquímica de proteína c-fos e o segundo corado com vermelho neutro (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) pelo método de Nissl. Para imunoistoquímica da proteína c-Fos, as secções foram lavadas em PBS e incubadas em 'overnight' sob agitação lenta (1 rpm) em temperatura controlada (24°C) com anticorpo policlonal de coelho contra o peptídeo sintético (4-17) da proteína c-Fos de humano (Calbiochem-Merck, Darmstadt, Alemanha). A seguir, as secções foram submetidas a uma incubação de 90 min com anticorpo secundário (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) e um tratamento de 90 minutos do complexo avidina-biotina-peroxidase (complexo AB), alternadas

com lavagem PBS. As secções do cérebro foram então submetidas a uma reação com uma solução de cromógeno de 2% de 3,3 "tetracloreto de - diaminobenzidine (DAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 600 µL de peróxido de hidrogénio à 30%. Após completamente secas as secções em lâminas foram adicionalmente intensificadas com tetróxido de ósmio (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e montadas em lamínulas de vidro e DPX (Aldrich Chemical Company, EUA). As secções foram examinadas por meio de microscopia de luz de baixa ampliação (Leica DM 2500 microscópio acoplado a DFC 300 FX câmara, Wetzlar, Alemanha).

2.9. Contagem das células

A densidade de células marcadas para proteína c-Fos (células / 0,1 mm²) foi calculada com o auxílio do programa Image-Pro Plus 7,01 (Media Cybernetics, Rockville, EUA). Após um exame preliminar das regiões mais marcadas do tronco cerebral, a densidade de imunorreatividade da proteína c-Fos (IRF) foi examinada em 2 níveis ântero-posterior do MCPA (-6,48 mm e - 8.16 mm do bregma), 1 nível anteroposterior do APBI (-8,88 mm do bregma) e 1 nível anteroposterior do NTS (-14,4 do bregma) baseado no atlas de cérebro de ratos de Paxinos e Watson (2007). Para a contagem de células foi usado uma máscara do programa Imagem-Pro Plus da área mais ativada de um determinado grupo de ratos que se repitiu na região correspondente dos grupos restantes.

2.10. Estatísticas

2.10.1. Efeitos do CO₂ sobre o comportamento de fuga evocados por KCN

Os efeitos de CO₂ tanto na duração quanto no número de travessias durante o comportamento de fuga provocado por KCN foram avaliados pelo Teste t de Stundet bicaudal. Os resultados são apresentados como médias \pm EP.

2.10.2. Efeitos das microinjeções de KCN na MCPD

Os efeitos das microinjeções de KCN na MCPD sobre os limiares de trote desencadeados pela estimulação elétrica do mesmo local que a microinjeção foram examinados por ANOVA de 2-vias para medidas repetidas (dose KCN vs tempo) seguido por um contraste com os limiares basais com um grau de liberdade.

2.10.3. Efeitos do CO₂ e do KCN na expressão da proteína c-Fos.

Os dados da marcação c-Fos são apresentados como a média da densidade de células marcadas/0,1 mm² (\pm SEM) ou como a percentagem de alteração (Δ) em relação a outros grupos. A densidade de células marcadas pela proteína c-Fos de cada núcleo foi examinado por ANOVA de uma via (tratamentos) seguido por teste t. Os efeitos do tratamento sobre a expressão de c-Fos de MCPAvl caudal e núcleo LDTg foram avaliados por análise de variância de duas vias seguida por comparações post hoc. As diferenças foram consideradas significativas para o critério de Bonferroni de 5%. As estatísticas foram realizadas com o software SAS (Statistical Analysis System, Cary, EUA).

3- RESULTADOS

3.1. Efeitos comportamentais da administração de KCN e/ou CO₂

A administração endovenosa de 40 µg de KCN produziu resposta de fuga de curta duração ($2,7 \pm 0,5$ s) em todos os ratos testados. O pré-exposição a 13% de CO₂ produziu aumentos significativos tanto na distância percorrida (número de cruzamentos) ($\Delta = 153\%$; $T_8 = 3,7$; $P < 0,01$) como na duração ($\Delta = 189\%$; $T_8 = 6,8$; $P < 0,0001$) da fuga produzida por KCN (Fig.1).

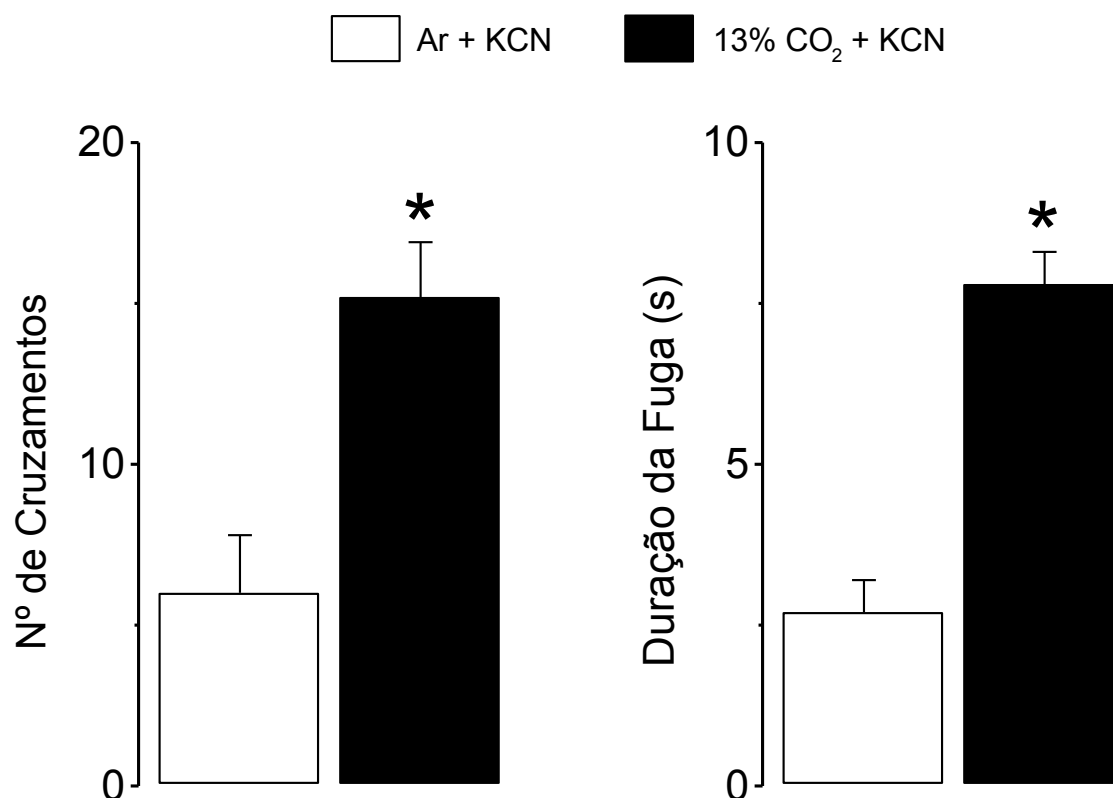


Figura 1. Número de cruzamentos (distância percorrida) e duração da resposta de fuga induzida por uma injeção endovenosa de cianeto de potássio (KCN, 40 µg, *in bolus*), quer isoladamente ou precedida por uma exposição de 30 s de CO₂ a 13%. * $P < 0,05$, significativamente diferente do ar/KCN (teste t pariado).

TABELA 1

KCN (pmol/100 nL)	n	Limiares de Trote Produzidos Eletricamente (μ A)		
		24 h antes KCN	1 min após KCN	24 h após KCN
12	10	40.5 \pm 3.5	43.5 \pm 3.0	42.0 \pm 4.0
25	10	30.0 \pm 3.2	34.0 \pm 1.2	33.5 \pm 2.2
50	9	32.8 \pm 6.1	36.7 \pm 4.6	36.1 \pm 4.0
100	10	33.0 \pm 2.3	37.5 \pm 2.6	40.5 \pm 3.2
150	5	40.0 \pm 4.2	38.0 \pm 4.1	44.0 \pm 6.6
200	5	31.0 \pm 2.9	34.0 \pm 5.3	40.0 \pm 6.1

Em contraste, nem a exposição a 13% de CO₂ sozinha, nem as microinjeções de KCN na MCPD produziram qualquer alteração no comportamento dos ratos. Os limiares do comportamento de trote produzido pela estimulação elétrica da MCPD também não diferiu nem entre as doses de KCN, nem entre os dias de injeção (Tabela 1). Embora a maioria das microinjeções de KCN foram localizadas na MCPAlr ou em suas proximidades (62%) (Figura 2), algumas injeções foram também localizadas na MCPAl, MCPAvl e nas camadas profundas do colículo superior. Em contraste, não houve microinjeções na MCPAdm e nos sectores caudais da MCPA.

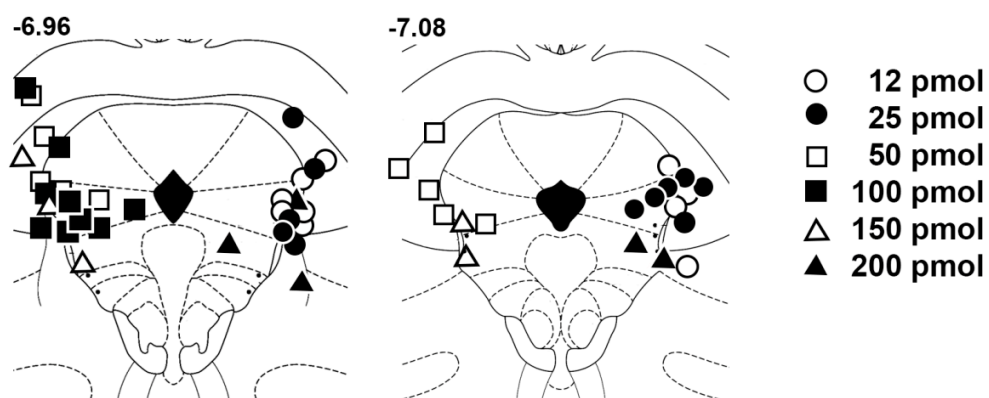


Figura 2. Locais de microinjeções cianeto de potássio (100 nl) na matéria cinzenta periaquedutal.

3.2. Efeitos da administração de KCN e CO₂ na expressão de c-Fos na MCPA

A ANOVA de 1 via mostrou diferenças significativas na IRF da MCPA ($F_{3,16} = 3,36$; $P = 0,05$) e, notadamente, MCPAvI ($F_{3,16} = 9,96$; $P < 0,001$).

Em comparação ao grupo controle de ar/SAL, a IRF da MCPA_{ar} apresentou um aumento moderadamente significativo no grupo em ar/KCN ($\Delta = 80\%$; $t = 3,03$; $P < 0,01$) (Fig. 3, 5). O IRF do grupo de ar/KCN também apresentou um aumento marginal em relação ao grupo CO₂/SAL ($\Delta = 47\%$; $t = 2,2$; $P = 0,04$). Em contraste, a IRF apresentou um aumento robusto na MCPAvI nos grupos ar/KCN ($\Delta = 217\%$; $t = 4,966$; $P < 0,0001$), CO₂/SAL ($\Delta = 166\%$, $t = 3,797$; $P < 0,005$) e de CO₂/KCN ($\Delta = 189\%$; $t = 4,316$; $P < 0,0005$) (Figs. 4-5).

A expressão de c-Fos da MCPAvI foi maior em uma parcela da MCPAvI do que na MCPAvI caudal (MCPAvI_c) propriamente e do que no núcleo tegmental laterodorsal (LDTg) (isto é, as regiões acima e abaixo do "grande capilar" da MCPAvI, respectivamente). A ANOVA de 2-vias revelou diferenças significativas tanto para os núcleos ($F_{1,32} = 40,1$; $P < 0,0001$) como para o tratamento ($F_{3,32} = 7,51$; $P < 0,01$) (figura 6). Comparados ao grupo controle ar/SAL, a IRF de MCPAvI_c foi marcadamente e significantemente aumentada somente no grupo de ar/KCN ($\Delta = 192\%$; $t = 3,17$; $P < 0,005$). A IRF da MCPAvI para o grupo ar/KCN foi também aumentado marginalmente em relação aos grupos CO₂/SAL ($\Delta = 77\%$; $t = 2,1$; $P = 0,04$) e CO₂/KCN ($\Delta = 57\%$; $t = 1,6$; $P = 0,08$). Em contraste a IRF do LDTg foi similarmente e significantemente aumentada nos grupos ar/KCN ($\Delta = 82\%$; $t = 3,05$; $P < 0,005$), de CO₂/SAL ($\Delta = 85\%$; $t = 3,18$; $P < 0,005$) e de CO₂/KCN ($\Delta = 102\%$; $t = 3,81$; $P < 0,001$).

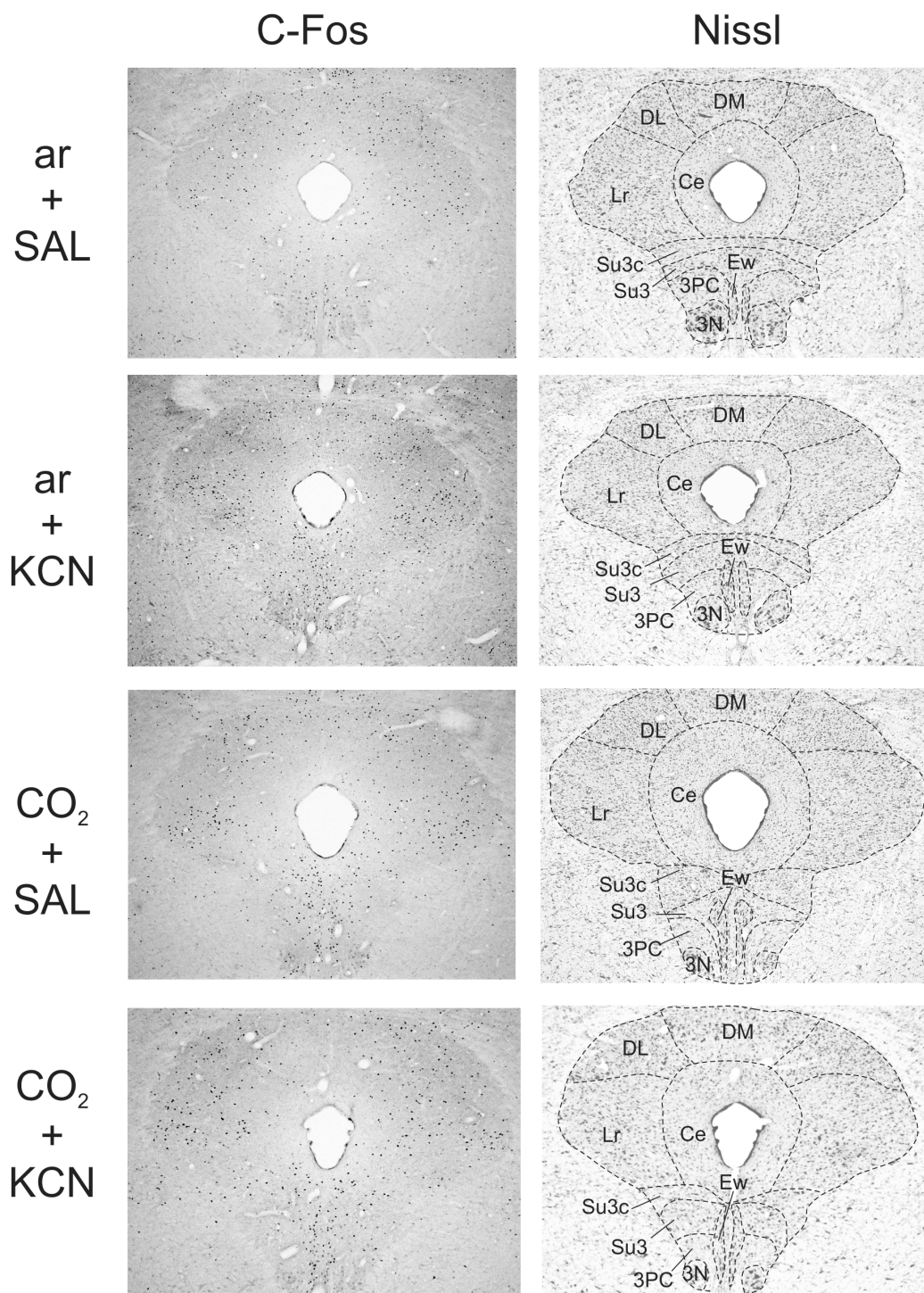


Figura 3. Expressão da proteína c-Fos (esquerda) e seções adjacentes corada em Nissl (à direita) da matéria cinzenta periaquedutal rostral (-6,48 mm do bregma) de ratos tratados com ar/SAL, ar/KCN, CO₂/SAL e CO₂/KCN. Abreviaturas: 3N - núcleo oculomotor, MCPAdm - matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial, MCPAdl - substância cinzenta periaquedutal dorsolateral, MCPAl - rostralateral periaquedutal massa cinzenta, Su - supraoculomotor da matéria cinzenta periaquedutal.

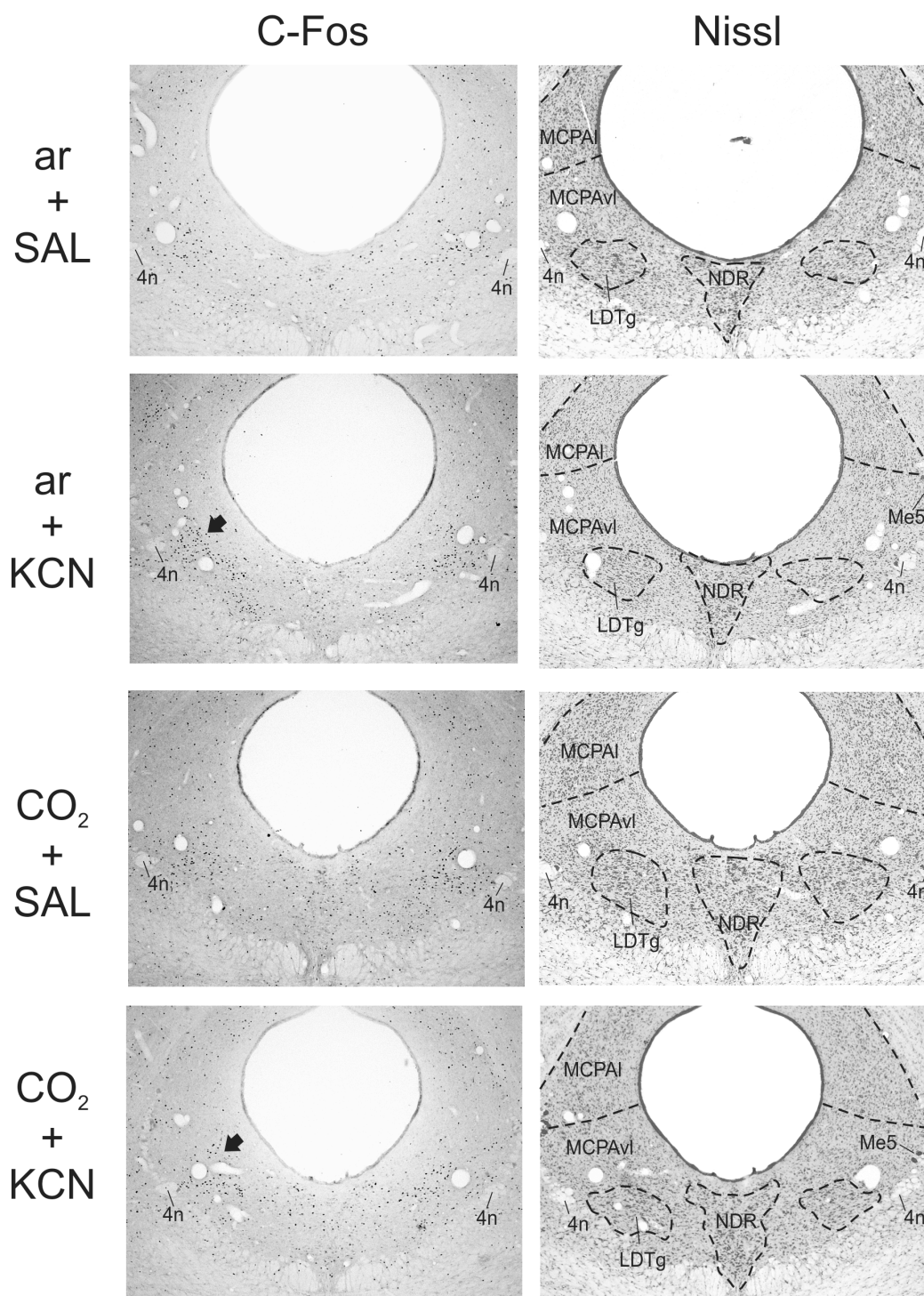


Figura 4. Expressão da proteína de c-Fos (esquerda) e secções adjacentes coradas em Nissl (direita) da matéria cinzenta periaquedutal caudal (-8,16 mm a partir da bregma) de ratos tratados com ar/SAL, ar/KCN, CO₂/SAL e CO₂/KCN. As setas indicam a expressão de c-Fos no topo do núcleo tegmental laterodorsal (LDTg). Abreviaturas: 4n - nervo troclear, DRN - núcleo dorsal da rafe, MCPAI - matéria cinzenta periaquedutal lateral, Me5Cp - Núcleo mesencefálico do trigêmeo, MCPAvl - matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral.

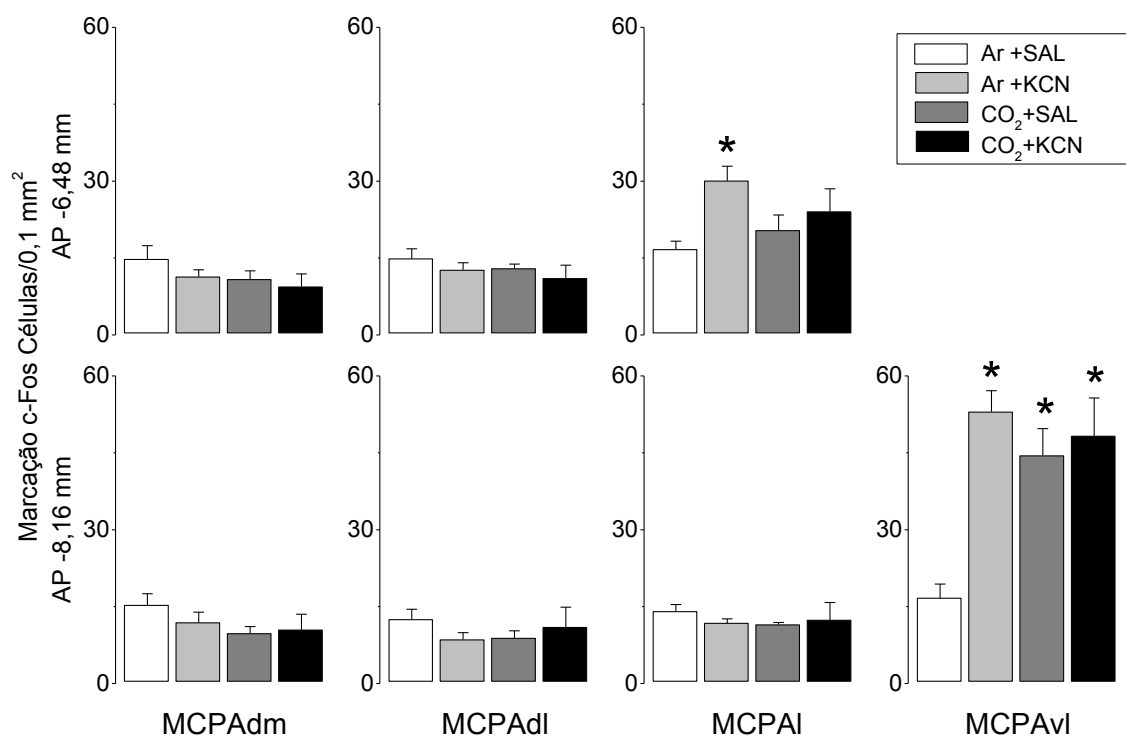


Figura 5. Densidade da expressão da proteína c-Fos na matéria cinzenta periaquedutal rostral e caudal de ratos tratados com ar/SAL, ar/KCN, CO₂/SAL e CO₂/KCN. * P <0,05, significativamente diferente do grupo de ar/SAL (nível significativo de Bonferroni de comparações post-hoc).

3.3. Efeitos da administração de KCN e CO₂ na expressão de c-Fos no NTS e no APBI

Os grupos também mostraram diferenças significantes na expressão de c-Fos no NTS caudal (NTSc, -14,4 mm do bregma) ($F_{3,16} = 4,86$; $P < 0,01$). A marcação foi mais intensa no NTS medial, ventral, ventrolateral e dorsolateral (Figs.7-8).

Comparado ao grupo controle de ar/SAL, a IRF foi significativamente aumentada no NTSc do grupo CO₂/SAL ($t = 2,76$; $P < 0,01$) e altamente marcada no grupo CO₂/KCN ($t = 3,59$; $P < 0,002$). A IRF do grupo CO₂/KCN apresentou também aumento marginal em relação ao grupo ar/KCN ($\Delta = 24\%$, $t = 2,02$, $P = 0,06$). Embora o aumento IRF do grupo ar/KCN não tenha atingido significância estatística em relação ao grupo controle ($t = 1,56$, $p = 0,13$), a IRF

apresentou aumentos progressivos no ar/KCN (46%), CO₂/SAL (82%) e CO₂/KCN (107%). Em contraste, os tratamentos não alteraram a expressão de c-Fos de APBI (Fig. 8).

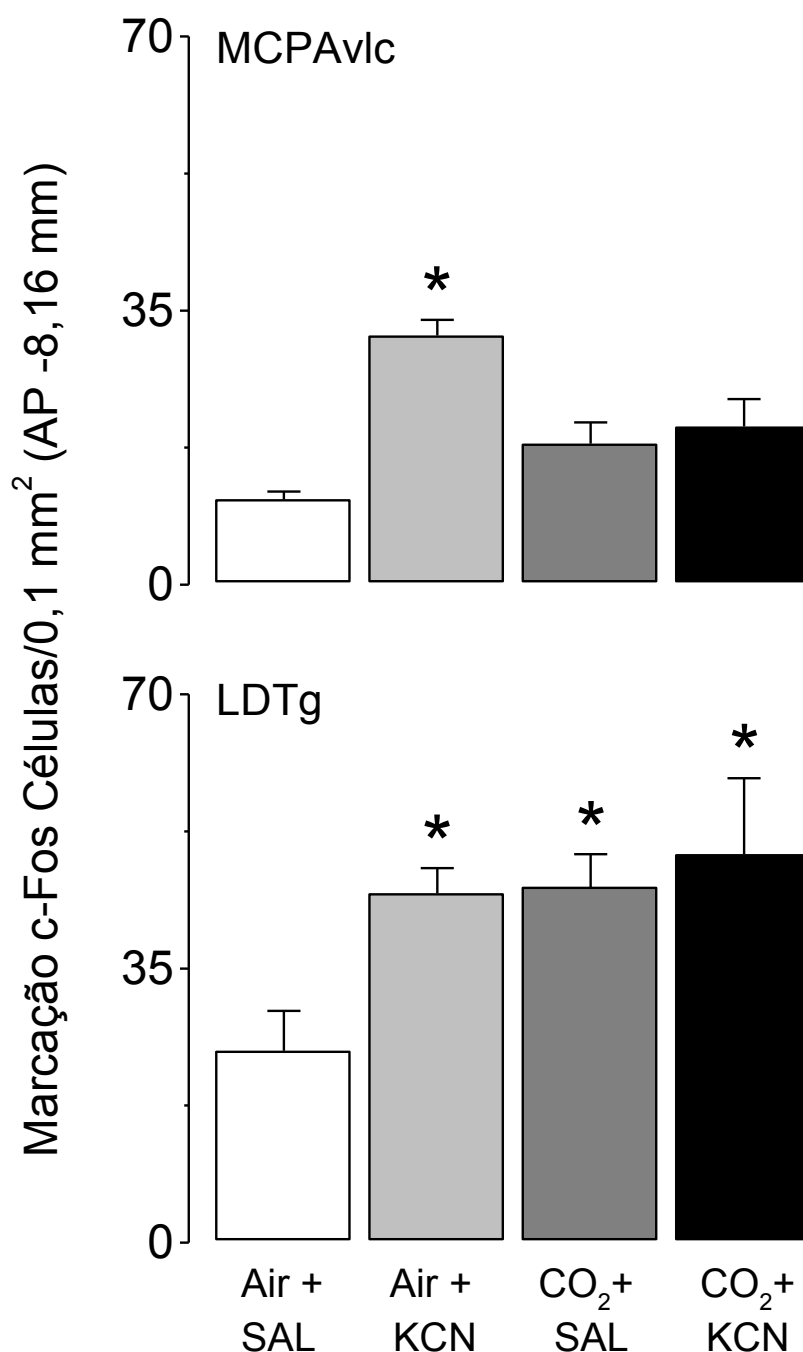


Figura 6. Densidade da expressão da proteína de c-fos na matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral caudal (cVLPAG) e núcleo laterodorsal tegmental (LDTg) de ratos tratados com ar/SAL, ar/KCN, CO₂/SAL e CO₂/KCN. * P < 0,05, significativamente diferente do grupo de ar/SAL (nível significativo de Bonferroni de comparações post-hoc).

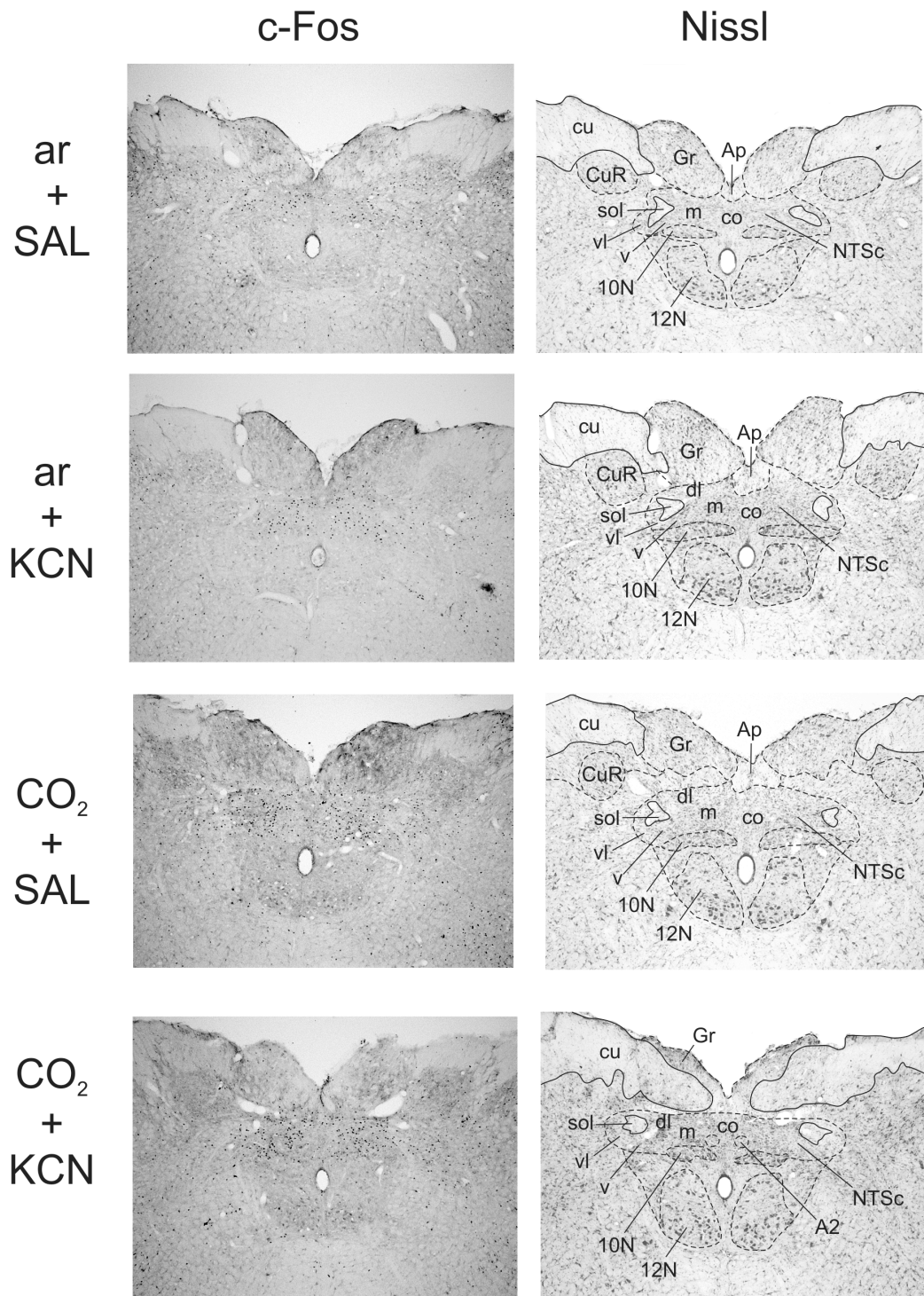


Figura 7. Expressão da proteína c-Fos (esquerda) e secções adjacentes coradas em Nissl (direita) da núcleo do trato solitário comissural (-14,4 mm a partir da bregma) de ratos tratados com ar/SAL, ar/KCN, CO₂/SAL e CO₂/KCN. 10N - núcleo motor dorsal do nervo vago, 12N - núcleo do hipoglosso, CC - canal central, conts - comissural núcleo do trato solitário, mnts - medial núcleo do trato solitário, Gr - núcleo gracilis, Cu - núcleo cuneatus, TS - tractus solitarius.

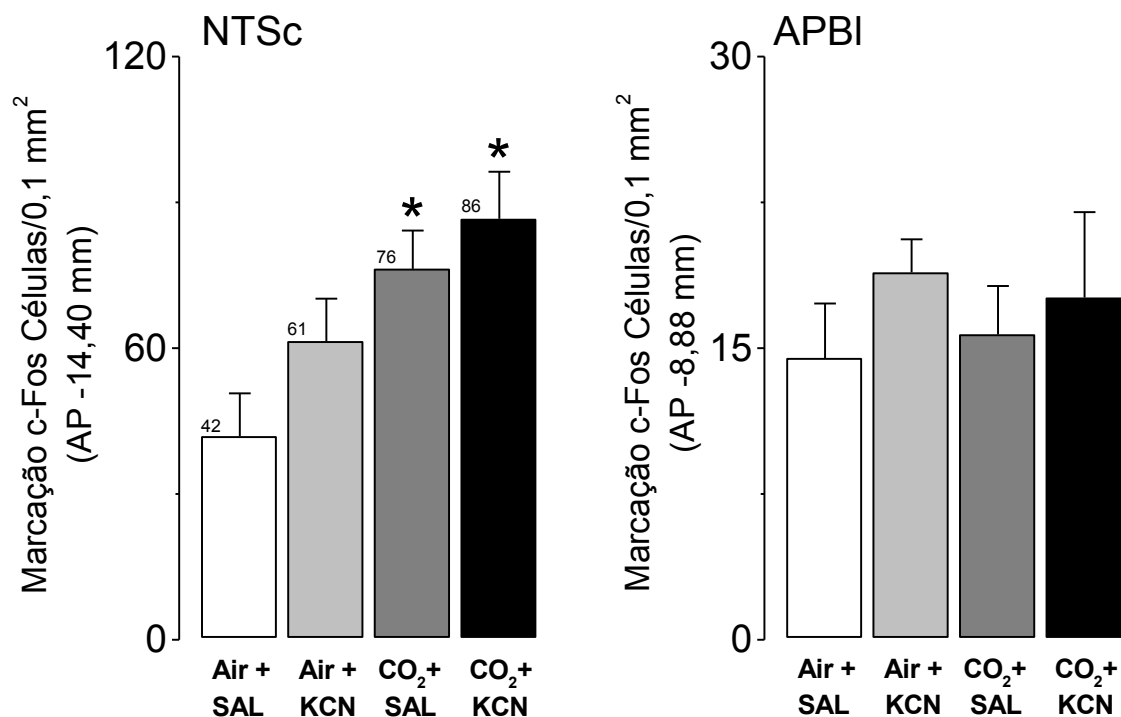


Figura 8. Densidade da expressão da proteína c-Fos (células / 0,1 mm²) em commissural núcleo do trato solitário (conts) e lateral área parabraquial (APBI) de ratos tratados com ar/SAL, ar/KCN, CO₂/SAL e CO₂/KCN. * P < 0,05, significativamente diferente do grupo de ar/SAL (nível significativo de Bonferroni de comparações post-hoc). Detalhes como na Figura 5.

4- DISCUSSÃO

Uma única injeção endovenosa de 40 µg de KCN produziu fuga de curta duração em todos os ratos testados. As respostas de fuga foram predominantemente trote, sendo galope e salto raros ou totalmente ausentes, respectivamente. Na verdade, a dose de KCN presente neste estudo é o dobro da dose mediana eficaz (ED₅₀) de trote, mas apenas 0,7 ED₅₀ da resposta de galope (Schimitel et al., 2012). Embora a exposição somente ao CO₂ (13%) não tenha produzido alterações evidentes no comportamento espontâneo dos ratos, esta exposição mais do que duplicou a distância percorrida (2,5 vezes) e a duração (2,8 vezes) da fuga quando em conjunto com a administração endovenosa de KCN. As notáveis diferenças das respostas comportamentais para as administrações separadas e combinadas de KCN e CO₂ sugerem que estes agentes ativam sistemas que se sobrepõem apenas parcialmente.

Embora as lesões eletrolíticas da MCPD bloquearam a fuga evocada por KCN (Schimitel et al., 2012), microinjeções de uma ampla gama de doses de KCN na MCPD (12-200 pmol) foram totalmente ineficazes. Estes resultados estendem as observações anteriores, mostrando que os comportamentos produzidos por KCN dependem da integridade tanto do nervo do seio carotídeo como dos quimiorreceptores carotídeos (Franchini e Krieger, 1993; Franchini et al., 1997). As microinjeções de KCN na MCPD também não alteraram os limiares de trote para a estimulação elétrica no mesmo local da injeção. Na verdade, 40 µg i.v. KCN (ou cerca de 25 pmol / 100 nL i.c.) é 15 vezes menor do que a dose letal média (DL50) de KCN i.v. em mamíferos (Barnes e Eltherington, 1973). A ineficácia das microinjeções de KCN descarta os efeitos tanto excitatório como citotóxico na MCPA.

Os ratos que tiveram reações de fuga, tanto ao KCN sozinho quanto ao KCN + CO₂, apresentaram aumentos significativos na expressão da proteína c-Fos em apenas quatro áreas do tronco cerebral, ou seja, o NTSc, a MCPAlr, a MCPAvlc e o LDTg. No entanto, enquanto os NTSc mostrou ativações mais robustas em ratos expostos ao CO₂ (IRF aumentou 82% e 107% nos grupos CO₂/SAL e CO₂/KCN, respectivamente), a MCPAlr e a MCPAvlc só foram ativadas no grupo de ar/KCN (IRF aumentou 80% e 192%, respectivamente). Estes dados estão em consonância tanto a uma sensibilidade intrínseca a hipercapnia como a uma menor sensibilidade à hipóxia (Coates et al., 1993; Berquin et al., 2000; Teppema et al., 1997) dos neurônios do NTS. Importante também ressaltar que IRF foi principalmente aumentada nos subnúcleos medial, dorsolateral e ventrolateral do NTS que são as principais regiões terminais das aferências do nervo do seio carotídeo (Panneton e Loewy, 1980).

Em comparação ao grupo ar/SAL, o núcleo LDTg foi marcadamente ativado nos grupos ar/KCN (98%), CO₂/SAL (102%) e CO₂/KCN (120%). A ativação não específica do LDTg sustenta seu já conhecido papel como um componente colinérgico de um sistema de ativação reticular ascendente especialmente preocupado com as estruturas límbicas, gânglios basais e mecanismos oculomotores (Cornwall et al., 1990).

Embora estudos anteriores de *tract-tracing* já haviam mostrado que o NTS se projeta tanto para MCPA (Bandler e Tork, 1987; Lv et al., 2010; LC Schenberg, dados não publicados) quanto para o núcleo LDTg, o presente estudo (Cornwall et al., 1990) tem a vantagem de demonstrar que as respostas evocadas por KCN são estritamente dependentes de entradas periféricas (Franchini e Krieger, 1993; Franchini et al., 1997) para mostrar os alvos

específicos dos neurônios de segunda ordem do NTS que medeiam entradas quimiorreceptoras para a MCPA (ou seja, o MCPAlr, MCPAvlc e LDTg). Além disso, o presente estudo sugere que os últimos núcleos desempenham um papel crucial nas respostas iniciais à asfixia. Em contraste, Casanova e colaboradores (2013) relataram que ratos expostos a hipóxia ambiental severa (6% de O₂) apresentaram "breves episódios de locomoção rápida e violenta" juntamente com aumentos significativos na IRF da MCPAdl (92%) e da MCPAlr (132%), mas não da MCPAdm e da MCPAvl, 0,6 milímetros caudal ao nível examinado no presente estudo. O padrão diferente de ativações do presente estudo e do estudo anterior pode ser devido às notáveis diferenças na duração de hipóxia (150 s) e nas injeções *in bolus* de KCN (~ 2 s). De fato, a MCPD foi extensivamente ativada após injeções repetidas de doses elevadas de KCN (60-120 µg, i.v.) em rato anestesiado (Hayward e Von Reizenstein, 2002). De outro modo, as diferenças podem ser devido à sensibilidade intrínseca a hipóxia dos neurônios da MCPD (Kramer et al., 1999). Se assim for, ativações por hipóxia são o resultado de entradas centrais e periféricas, enquanto as ativações por KCN são devido a apenas entradas periféricas. Tomados em conjunto, os dados sugerem que ocorra uma resposta de dois estágios à hipóxia, onde as ativações do NTS medeiam ativações iniciais da MCPAlr, MCPAvlc e LDTg que são substituídos pelas ativações posteriores dos setores caudais da MCPAdl e MCPAl, incluindo o MCPAce (ver, por exemplo, a ativação MCPAce na Fig.6 de Hayward e Von Reizenstein, 2002).

Como asfixia é tanto hipóxia como hipercapnia, espera-se que a asfixia ative outros sistemas além daqueles ativados por hipóxia. Comparado ao grupo ar/KCN, IRF dos ratos CO₂/KCN, que mostraram uma fuga mais robusta, foi

efetivamente reduzido, embora não significativamente, tanto em MCPA_{Ir} (-20%) como na MCPA_{Vlc} (-36%). Apesar dos ratos injetados com KCN apresentarem tanto fuga quanto ativações da MCPA_{Ir} e da MCPA_{Vlc}, é improvável que a potenciação de CO₂ na fuga evocada por KCN no grupo de CO₂/KCN seja mediada pela inibição das últimas áreas. Por outro lado, os ratos do grupo CO₂/KCN apresentaram aumentos adicionais na IRF no LDTg (11%) e, marcadamente, no NTSc (41%) em relação ao grupo de ar/KCN. Embora não alcançaram significância estatística, é interessante salientar que os seres humanos sob ventilação mecânica sentem "fome de ar" em pressão parcial alveolar de CO₂ 43 mmHg, ou seja, apenas 4 mmHg (10,2%) acima da pressão parcial no fim da expiração de CO₂ (P_{ET}CO₂). Por sua vez, a P_{ET}CO₂ de 50 mmHg (isto é, um aumento de apenas 28%) produz uma "fome ar" insuportável (Banzett et al., 1996). Comparado ao grupo ar/KCN, a ativação adicional do CO₂ no LDTg e NTSc do grupo CO₂/KCN são da mesma ordem que as alterações que P_{ET}CO₂ provocam na "fome de ar" em humanos. Tomados em conjunto, estes dados sugerem que a potenciação produzida pelo CO₂ na fuga evocada por KCN é provavelmente mediada pelo aumento da ativação de NTSc e LDTg. A mediação pelo LDTg no pânico tipo respiratório é ainda mais sustentada pelo bloqueio dos ataques de pânico evocado por CO₂ através do agente antimuscarínico biperideno (Battaglia et al., 2001). Em todo o caso, deve notar-se que a asfixia da vida real é sempre mais hipóxia do que hipercapnia. Assim, é tentador especular que enquanto os ratos tratados com KCN foram, no máximo, excitados, os ratos tratados com CO₂/KCN estavam à beira de um ataque de pânico de tipo respiratório.

Por sua vez, é notável que áreas do tronco cerebral cruciais para o controle respiratório, tais como a APBI, o complexo pré-Bötzinger (pBöC) e a superfície ventral do bulbo (SVB) não foram ativadas em ambos os grupos. Estes dados sugerem que o sistema de alarme de sufocamento pode detectar hipóxia antes mesmo do que os centros respiratórios da eupnéia. De outra forma, as respostas respiratórias para asfixia poderiam depender de mecanismos distintos que aqueles da eupnéia. Por exemplo, a MCPAI envia uma projeção muito compacta para neurônios do NRA (Holstege et al., 1997) que pode estar envolvida na geração do ritmo inspiratório caudal ao OBEX (Jones et al., 2012). Seja como for, a falta de ativações conspícuas de núcleos respiratórios de ratos que fogem tanto no grupo ar/KCN como no grupo CO₂/KCN torna improvável a "hipótese corolário", segundo a qual os sentimentos de asfixia são o resultado do processamento cortical de um "cópia eferente" da atividade dos neurônios dos centros respiratórios (Banzett et al., 1989; Moosavi et al., 2004).

Como o nervo do seio carotídeo transmite sinais tanto de hipóxia como de hipercapnia, era esperado que concentrações apropriadas de CO₂ pudessem provocar fuga de forma tão eficaz como o KCN. No entanto, os ratos expostos somente ao CO₂ não fogem apesar de IRF apresentar aumentos significativos no NTSc em relação ao grupo ar/SAL e, marginalmente ($P < 0,04$) em relação ao grupo ar/KCN. Por conseguinte, nem o CO₂ sozinho, nem a ativação do NTS são suficientes para elicitar a fuga. No mesmo sentido, estudos anteriores mostraram que a exposição à concentrações de CO₂ tão altas quanto 20% falharam em provocar fuga em ratos e em gatos (Johnson et al., 2011; Schimitel et al., 2012; Larnicol et al., 1994). Em particular, o aumento

rápido (5 s) na concentração de CO₂ de até 20% não provocou fuga, apesar de produzir a ativação significativa de neurônios (presumivelmente inibitórios) da MCPD (Johnson et al., 2011). Da mesma forma, exposições tanto de 8% quanto de 13% de CO₂ atenuaram fuga tipo pânico produzidos por estimulação elétrica da MCPD (Schimitel et al., 2012). Como pré-exposições ao CO₂ aumentou a IRF produzida por KCN no NTSc e LDTg, enquanto diminuiu a ativação das MCPAlr e MCPAvlc, a inibição do CO₂ nas fuga evocadas na MCPD é provavelmente devido a entradas principalmente de neurônios sensíveis ao CO₂ do SVB. De fato, Loewy e colaboradores (1981) há algum tempos mostrado que o SVB envia projeções proeminentes tanto para a MCPAvlr como para a MCPAvlc. Mais notavelmente, estes autores relataram que a depleção de 5-HT com 5,7-dihydroxytryptamine suprimiu marcação de autoradiografia de todas as regiões rostrais ao colículo inferior, incluindo a MCPA. Estudos posteriores mostraram que, enquanto a MCPD recebe aferências 5-HT da rafe dorsal, da rafe obscura, da rafe pontina e da rafe mediana, a MCPAvl recebe aferências 5-HT somente do núcleo magno da rafe (NMR) e esparsos neurônios 5-HT dos núcleos gigantocelular e paragigantocelular. A participação de NMR na quimiossensibilidade é ainda apoiada pela sua ativação tanto em ratos como em seres humanos expostos a atmosferas de 15% e 35% de CO₂, respectivamente (Teppema et al, 1997;. Goossens et al., 2014). Além disso, um estudo recente de Brust e colaboradores (2014) apresentaram provas de que uma linhagem celular específica do NMR participa na quimiossensibilidade ao CO₂ (mas não nas respostas motoras respiratórias). É importante notar, também que, embora a estimulação química do NMR não produziu alterações significativas nem na

conduta (Bett e Sandkhuler, 1995) nem nos valores cardiovasculares e respiratórios (Schenberg e Lovick, 1995), ela produziu a inibição sustentada da hipertensão e da hiperpnéia a estímulos elétricos da MCPD (Schenberg e Lovick, 1995). As projeções serotoninérgicas do NMR para MCPA poderiam então ser a base das inibições do CO₂ e da fluoxetina na MCPA e da fuga evocadas por KCN, respectivamente (Schimitel et al., 2012, 2014).

Embora ratos conscientes submetidos a exposições prolongadas (2-3 h) de CO₂ (5-15%) (Teppema et al., 1997; Berquin et al., 2000) mostraram ativações da MCPAvl e do LDTg, exposições prolongadas à hipóxia (9 -11% de O₂) mostraram efeitos mistos, quer aumentando (Berquin et al., 2000) quer diminuindo a expressão de c-Fos nestas áreas (Teppema et al., 1997). Em contraste, as áreas caudais da MCPAdl e MCPAl tradicionalmente considerados como os principais efetores de fuga (Bandler e Depaulis, 1991; Bittencourt et al, 2004), não foram ativadas nem nos últimos estudos nem no presente. Estes resultados levantam a questão de saber se a fuga é mediada pela MCPAlr, pela MCPAvlc ou pelo LDTg. Na verdade, embora o MCPAlr foi principalmente relacionada com a "*backward defense*" (Bandler e Depaulis, 1991), é difícil de conciliar essa resposta com o fato de que a MCPAlr não é ativada pela exposição a um predador (Canteras e Goto, 1999). Por sua vez, Canteras e colaboradores (Sukikara et al., 2006; Mota-Ortiz et al., 2009) apresentaram evidências que a MCPAlr funciona como uma área chave que comuta ('switches') entre os comportamentos maternos e de caça. Além disso, eles mostraram que a MCPAlr recebe aferências da MCPAvlc, incluindo a região sensível a KCN no topo da LDTg (Mota-Ortiz et al., 2009). As últimas projeções poderiam, assim, estar envolvidas nas mudanças dos

comportamentos defensivos maternos e os evocados por hipóxia. Por sua vez, o MCPAvlc foi proposto por mediar a imobilidade em vez de fuga (Bandler e Depaulis, 1991; e Morgan Carriave, 2001). O exame mais atento destes últimos estudos revelam, porém, que os estímulos químicos de MCPAvlc produziu fuga tanto moderada quanto intensa, eventualmente. Além disso, estudos de nosso laboratório (Bittencourt et al., 2004; Schenberg et al., 2005) mostraram que a estimulações elétricas de alta resolução, baixa intensidade e frequência variada da MCPAvl provocou trote tanto quanto a estimulação da MCPAdl e MCPAlc. Notavelmente, no entanto, estimulações MCPAvl falhou em produzir galope ou salto assim como as estimulações por KCN no presente estudos e em estudos anteriores (Schimitel et al., 2012). Tomados em conjunto, estes dados sugerem que o MCPAvlc e MCPAlr são os principais componentes de um sistema de alarme de sufocamento sensível à hipóxia. Propõe-se também que durante a asfixia ambiental, as entradas periféricas para MCPAvlc e MCPAlr são mais potenciadas pelos efeitos excitatórios diretos de hipóxia sobre os neurônios das regiões caudais da MCPD (Kramer et al., 1999; Horn et al., 2000).

Os presentes dados também levantam a questão se a MCPAvlc corresponde à área de "MCPAl ventral" (MCPAvl) que quando estimulada produz taquipnéia acentuada em ratos e em gatos (Subramanian et al., 2008; Subramanian e Holstege 2013). Mais notavelmente, estímulos químicos da última área produziu taquipnéia, juntamente com a inibição paradoxal de neurônios pré-inspiratórios do pBöC (Subramanian e Holstege, 2013). A falta de ativação do pBöC no presente estudo reforça a possibilidade de que o site taquipnéico (MCPAvl) e o local responsivo ao KCN (MCPAvlc) são a mesma área. Embora a MCPAvl e a MCPAvlc estão localizadas em planos coronais

próximos (ou seja, -8 mm e -8,16 a partir do bregma, respectivamente), a identificação precisa do local taquipnéico foi comprometida pela distorção evidente tanto da forma quanto da divisão em parcelas da secção da MCPA mostrando a ponta da micropipeta (ver Fig.9 de Subramanian e Holstege, 2013). A comparação da secção da MCPA de Subramanian e Holstege (2013) com uma secção similar (- 7,97 milímetros a partir da bregma) coradas para NADPH diaforase de Paxinos e colaboradores (2009) sugere, no entanto, que MCPAvI e MCPAvIc no topo do LDTg são uma mesma área.

Por último, em uma apresentação preliminar da teoria do alarme falso de sufocamento de pânico, Klein (1993b) sugeriu que o gerenciamento dos sintomas de ataques de pânico "parecem ser um bolo de três camadas. A primeira camada é a reação do sistema de alarme de sufocamento, uma vez que recebeu um incremento de CO₂, pela falta de ar e aumento do volume corrente. Quando o sistema de controle mantém recebendo sinais interpretados como preditivo de asfixia, em seguida, o ataque de pânico, com a sua sensação de asfixia e vontade de fugir é liberado, seguido pelo aumento da frequência respiratória ". Em particular, ataques de pânico, tanto por inalação de 35% de CO₂ quanto por infusão de lactato de sódio à 0,5 M, são caracterizados por dispnéia precoce seguida de pânico, desejo de fuga e sustentada hiperventilação, que continua por vários minutos após o final da infusão (Klein, 1993 a, b; Goetz et al., 1996, Perna et al., 2004). O modelo de dois estágios de asfixia do presente estudo tem uma estreita semelhança com o modelo de bolo de três camadas de Klein para os ataques de pânico do tipo respiratório.

ESTUDO II:

**ISOLAMENTO SOCIAL NEONATAL PRODUZ AUMENTOS SELETIVOS DA
IMUNORREATIVIDADE À PROTEÍNA C-FOS DA MATÉRIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL DORSOLATERAL E DO NÚCLEO PRÉ-MAMILAR
DORSAL DO HIPOTÁLAMO DE RATOS ADULTOS EXPOSTOS A UM GATO**

RESUMO

Vários estudos indicam que eventos traumáticos na infância predispoem o indivíduo ao desenvolvimento de transtornos ansiosos e depressivos. Em particular, existem evidências abundantes que a ansiedade de separação da infância (ASI) predispoem o indivíduo aos ataques de pânico (AP) na vida adulta. De fato, estudos anteriores do nosso laboratório mostraram que o isolamento neonatal social (INS) facilita fuga por estimulação elétrica da parte dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MPCD), um modelo de AP. Como a predação é a maior ameaça ao filhote isolado, não está claro se o INS produz facilitação perene dos circuitos ativados pela exposição da presa ao predador. Portanto o presente estudo examinou se o INS produz aumentos adicionais da imunorreatividade da proteína c-Fos (IRF) e dos comportamentos de defesa de ratos expostos ao gato na vida adulta. Resumidamente, filhotes machos de ratos Wistar ($n = 60$) foram submetidos ao INS (3 h) ou a manipulação diárias (1 min) do 2º dia pós natal (PN2) até o desmame (PN22). O INS foi realizado colocando-se metade da ninhada em caixas individuais num compartimento com som atenuado. Ao mesmo tempo, os irmãos (isolamento neonatal fictício, INF) e a mãe foram colocados em outra caixa numa sala separada. Os controles (CTR) permaneceram com as mães ao longo de todo o período de amamentação. Entre 60 a 80 dias de idade os ratos eram habituados (10 min) por 3 dias à caixa de confratação e no dia seguinte expostos ao gato por 10 min. Duas horas após, os ratos eram perfundidos e seus cérebros removidos e processados para imunoistoquímica da proteína c-Fos. A densidade de células marcadas (células marcadas/0,1 mm²), bem como os comportamentos à exposição ao gato foram avaliados por análise de variância de 1-via seguida de

teste de Bonferroni. A exposição dos ratos ao gato produziu respostas inatas de medo, tais como de congelamento (*freezing*), esquiva e avaliação de risco em todos os grupos (INS, INF e CTR). Também produziu aumentos significantes da densidade de neurônios marcados em áreas tradicionalmente relacionadas à defesa de predadores (MCPAdI, PMd e HA). Mais notavelmente, no entanto, estas áreas nos ratos INS apresentaram IRF aumentada quando comparados aos CTR. Em contraste, não houve diferenças de marcação na amígdala. Estes resultados sugerem que o INS promove sensibilização perene da circuitaria relacionada à predação. Sugerem ainda que a ASI aumenta a vulnerabilidade do indivíduo adulto aos AP não respiratório.

ABSTRACT

Several studies indicate that early-life stress predisposes the individual to the later development of anxiety and depression. In particular, there is abundant evidence that childhood separation anxiety (CSA) predisposes individuals to panic attack (PA) in adulthood. In fact, previous studies from our laboratory have shown that neonatal social isolation (NSI) facilitates escape by electrical stimulation of dorsal part of the periaqueductal gray matter (PAG), an AP model. As predation is the greatest threat to isolated puppy, it is unclear whether the NSI produces perennial facilitation of circuits activated by exposure of prey to predator. Therefore, the present study examined whether the NSI produces further increases of the Fos-like immunoreactivity (FLI) and of the defense behaviors of rats exposed to cat in adulthood. Briefly, Wistar rats male pups ($n = 60$) were subjected to NSI (3h) or daily manipulation (1 min) from postnatal day 2 (PN2) until weaning (PN22). The NSI was carried out allotting half of litters in individual boxes placed inside a sound-attenuated chamber. Meanwhile, siblings (fictive social isolation rats, FSI) and dam were moved to another box in a separate room. The controls (CTR) remained with their mothers throughout the lactation period. Between 60 to 80 days-old the rats were habituated (10 min) for 3 days at confrota  o box and the next day exposed to cat for 10 min. Two hours later, they were perfused and its brains were removed and processed for c-Fos immunohistochemistry. Differences of c-Fos immunoreactivity were assessed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's t-test. Exposure of rats to cat produced innate fear responses, such as freezing, escape and risk assessment in all groups (INS, INF and CTR). Also produced marked increases in density of labeled neurons in areas traditionally

related to defense from predators (PAG dorsolateral-DLPAD; pre-mammillary nucleus-PMd and anterior hypothalamic núcleo-AHN). More significantly, however, these areas in the rats of the NSI group had FLI increased compared to the rats of the CTR group. In contrast, there were no differences marking the amygdala. These results suggest that the NSI promote perennial awareness of the circuitry related to predation. They also suggest that the CSA increases the vulnerability of the adult individual to non-respiratory AP.

1- INTRODUÇÃO

Estudos indicam a existência de uma forte correlação entre eventos traumáticos da infância e anormalidades comportamentais e neuroendócrinas na vida adulta (Kendler et al., 1992). Crianças que sofreram abusos físicos, ou que foram negligenciadas pelos pais, ou ainda, que vivenciaram experiências de divórcio ou privação dos cuidados maternos, podem tornar-se mais susceptíveis às psicopatologias (Bowlby, 1983; Manicavasagar et al., 1998; Rinne et al., 2000; Heim e Nemeroff, 2001; Teicher et al., 2003; Preter e Klein, 2008). Segundo John Bowlby (1983) o relacionamento afetoso, íntimo e próximo, da mãe, ou figura-materna, na primeira infância (1 a 3 anos de idade) favorece o desenvolvimento de uma personalidade saudável e a ausência do cuidado materno resultaria em ansiedade de separação da infância (ASI) e desenvolvimento de 'personalidade insegura' e transtornos psiquiátricos na vida adulta (Ainsworth e Bowlby, 1991; Bowlby, 1983; Bretherton, 1992).

Experimentos com ratos recém nascidos mostram que o desenvolvimento do sistema nervoso é sensível ao estresse na infância e, em particular, à privação materna. Além disso, as respostas adaptativas ao estresse podem ser modificadas por eventos que ocorreram no período neonatal (Meaney et al., 1993; Faure et al., 2007). De fato, os estímulos tácteis, olfatórios e auditivos da mãe nos primeiros dias de vida são os estímulos mais importantes no desenvolvimento do sistema nervoso dos filhotes (Caldji et al., 1998; Field et al., 1988; Gunnar, 2003; Kuhn e Schanberg, 1998; Newport et al., 2002; Suchecki, 1993). As evidências mostram que intervenções neste período que alteram a relação mãe-filhote, bem como o comportamento da mãe, têm efeitos significativos no desenvolvimento do filhote. Em particular, o

isolamento neonatal social (INS) causa a facilitação, tanto das respostas respiratórias à hipóxia e hipercapnia (D'Amato et al., 2011; Kinkead et al., 2005; Genest et al., 2004; Genest et al., 2007a,b; Dumont et al., 2011) como da atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal de ratos adultos (Francis e Meaney, 1999).

Em particular, a separação maternal, forma mais estudada de estresse infantil, esta relacionada a ASI. A ASI é um transtorno no qual a separação da criança da figura de apego, geralmente a mãe, é acompanhada de ansiedade excessiva (DSM V - APA, 2014). Segundo Klein (1980) a ASI é um conjunto de sintomas e comportamentos de ansiedade que refletem a ativação de um sistema neurofisiológico de alarme que protege o jovem de rupturas reais, ou potenciais, dos laços familiares. Mais importante, a ASI apresenta alta comorbidade em adultos com o TP, agorafobia, dentre outros transtornos (Klein, 1964; Klein R., 1995; DSM V- APA, 2014).

Embora vários estudos relacionem os transtornos psiquiátricos ao estresse infantil, Roberson-Nay e colaboradores (2012a) apresentaram evidências epidemiológicas em gêmeos de que o estresse infantil só contribui com 1,2 % dos AP na vida adulta. Em contraste, fatores genéticos e ambientais da vida adulta contribuiriam com 38 % e 60 % da incidência de ASI e AP, respectivamente. Contudo, Quintino-dos-Santos e colaboradores (2014) mostraram que AP experimental produzidos por estimulação elétrica da parte dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MCPD) são marcadamente facilitados em ratos que foram submetidos ao INS de 3 horas diárias ao longo de toda amamentação.

A estimulação elétrica da metade dorsal da MCPA produz comportamentos defensivos e emoções similares aos ataques de pânico (Bittencourt et al., 2004; Nashold et al., 1969). De fato, estudos de Nashold e colaboradores (1969) demonstraram que a estimulação elétrica da MCPA de humanos provoca ansiedade intensa, pânico, sudorese, medo de morrer, dispnéia, taquicardia e tremores, dentre outros sintomas somáticos, fisiológicos e cognitivos. Estudos com estimulação elétrica e química da MCPA de ratos provocam reações defensivas de 'congelamento' (exoftalmia, imobilidade) e fuga (Schenberg *et al.*, 2001; Bittencourt *et al.*, 2004).

Blanchard e colaboradores (1989a; 2005) sugeriram, por outro lado, que as respostas naturais de defesa de ratos confrontados ao predadores são similares ao pânico. Dentre estas respostas os ratos apresentam comportamentos de fuga, congelamento (freezing) e ameaça ou ataque defensivos. Contrariamente, a exposição de roedores ao odor do gato produz comportamentos de avaliação de risco que têm sido relacionados ao transtorno de ansiedade generalizada (TAG). Contudo é importante notar que os pacientes de pânico não são agressivos (irritáveis) (APA, 2014). Também, não está claro se o modelo da exposição ao predador é um modelo de AP ou de fobia.

Em particular, fobias específicas são clinicamente classificadas como medos de altura, de dano corporal ou sangue, de espaços fechados e de pequenos animais, tais como aranhas ou cobras. Embora os AP sejam frequentemente igualados ao medo, a relação do pânico com fobias específicas não está esclarecida. Assim, enquanto, alguns estudos relacionem TP com fobia social e fobia simples (Vollebergh et al., 2001; Segui et al., 1999, 2001),

outros indicam uma relação mais acentuada da fobia com TAG (Goisman et al., 1998; Noyes et al., 1992; Noyes, 2001). No mesmo sentido, Tannure e colaboradores (2008) observaram que ratos submetidos ao abrasamento (*kindling*) da amígdala que desenvolveram fobia ao experimentador (resistência à captura) apresentaram uma atenuação das respostas de pânico induzidos pela estimulação elétrica da MCPA, indicando que os ataques fóbicos possam ser mediados por mecanismos neurais distintos daqueles do pânico.

Também, não está claro se o estresse na infância facilita comportamentos de defesa e/ou estruturas neurais subjacentes. Em particular, exposição de roedores ao predador ou ao seu odor ativa uma série de estruturas neurais. Dentre estas estruturas, destacam-se as áreas do hipotálamo medial, tais como o hipotálamo anterior (HA), a parte dorsomedial do hipotálamo ventromedial (VMHdm) e o núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) (Canteras et al., 1997, 2001, 2002, 2003; Canteras & Goto, 1999; Comoli et al., 2003; Dielenberg et al., 2001 e Gross & Canteras, 2012). A exposição ao predador também ativa regiões específicas da amígdala como a amígdala lateral (AL), a amígdala basomedial posterior (ABMep) e a amígdala medial porteroventral (AMepv) (Dielenberg et al., 2001; Martinez et al., 2011; Gross & Canteras, 2012). Estes estudos sugerem que o hipotálamo e a amígdala estariam envolvidos no processamento de pistas relacionadas à presença do predador e na análise contextual do ambiente. Outra estrutura ativada na exposição de ratos ao gato é a coluna dorsolateral da MCPA (MCPAdl), tradicionalmente envolvida nas respostas de defesa (Canteras & Goto, 1999; Dielenberg et al., 2001; Gross e Canteras, 2012).

Como a maior ameaça ao filhote isolado é a predação, o presente estudo examinou se o INS tem efeitos perenes sobre as respostas comportamentais e o padrão de ativação da proteína c-Fos em ratos expostos ao gato na vida adulta.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Animais

Ratas Wistar prenhas, primíparas, fornecidas pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas foram mantidas numa sala com temperatura controlada (aproximadamente 23 °C) e ciclo claro-escuro regular (12 X 12 h, luzes acesas às 6:00 h). As ratas foram alojadas individualmente em gaiolas de polietileno medindo 49 cm x 34 cm x 16 cm (caixa ninho), com água e comida à vontade. No 1º dia pós-natal (PN2) foram feitas as sexagens para a padronização das ninhadas (máximo de 8 animais), permanecendo somente os machos com suas respectivas mães até o desmame (PN22). Destas ratas primíparas foram utilizados somente 30 filhotes, onde 20 foram submetidos ao protocolo de isolamento neonatal social e 10 permaneceram com suas mães até o desmame e compuseram o grupo controle. Os procedimentos foram aprovados e realizados de acordo com o comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES 01/2015).

2.2- Isolamento Neonatal Social

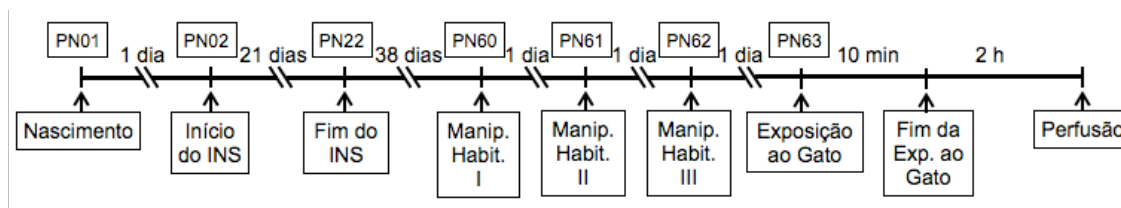
Em P2 os filhotes (n = 20) eram marcados no dorso com uma caneta dermatográfica (Texta Fineline 700) para a distinção dos grupos isolados da mãe (INS) e os mantidos com a mãe (INF). Durante o procedimento de isolamento neonatal social (INS), os ratos INS eram acomodados individualmente em caixas de separação (30 cm x 20 cm x 13 cm) e os ratos INF eram manipulados por 1 minuto apenas e transportados com a mãe para uma nova caixa ninho, doravante chamada caixa controle. O cheiro e a comunicação com

a mãe eram atenuados colocando-se as caixas de separação num compartimento fechado (49 cm x 66 cm x 96 cm) com uma abertura para ventilação (10 cm x 10 cm). A privação materna era realizada pela separação dos filhotes por 3 horas, entre 7:30 h e 11:30 h, de PN2 a PN22. Ao término das sessões tanto os ratos dos grupo INS como do grupo INF retornavam para a caixa ninho juntamente com suas mães. No grupo controle (CTR) os ratos permaneciam com suas mães durante todo o período de amamentação, sendo manipulados apenas 1 vez na semana para troca de maravalha e limpeza da caixa. Após o desmame, cada grupo de ratos (CTR, INS e INF) eram alojados em gaiolas com 2 a 4 animais e com água e comida *ad libitum*, onde permaneciam até o protocolo de exposição ao gato (PN60-PN80). Os animais eram manipulados por um único pesquisador que também realizava a limpeza das caixas a cada 7 dias.

2.3- Aparato de exposição ao gato

O aparato consistiu numa arena retangular (147,5 cm X 32 cm X 49 cm) com o assoalho e 3 paredes opacas e uma parede frontal de vidro. Os comportamentos foram filmados por câmeras instaladas em posição anterior e superior à arena. A caixa era dividida em dois compartimentos por uma grade metálica: um compartimento menor para o gato (37 cm X 32 cm X 49 cm) e outro maior para o rato (110,5 cm X 32 cm X 49 cm). A arena do rato era dividida em 3 setores (setores adjacente, próximo e distante do gato) de cerca de 40 cm de comprimento.

2.4- Procedimento



Quando adultos, os ratos eram submetidos a 5 minutos de manipulação e 10 minutos de habituação à caixa de confrontação por 3 dias consecutivos (PN60-PN62). Durante as sessões de habituação os ratos eram colocados frontalmente ao compartimento do gato e observados por 10 minutos. Vinte e quatro horas após a terceira sessão de habituação, os ratos eram colocados no setor adjacente ao gato, voltados para o mesmo e filmados por 10 minutos. Todas as sessões de exposição ao gato foram filmadas para análise posterior. Metade dos animais de cada grupo foram submetidos ao procedimento de imunistoquímica para proteína c-Fos.

2.5- Protocolo de imunistoquímica c-Fos

Duas horas depois da sessão experimental os ratos ($n = 15$) eram anestesiados com tiopental (50 mg/kg, i,p) e perfundidos por via cardíaca com 300 ml de salina e 500 ml de paraformaldeído 4% em tampão fostato 0,1 M (PBS, pH = 7,4). Após a perfusão, os cérebros eram removidos e fixados por no mínimo 3 hora em fixador sacarose 30 % e estocados por no mínimo 7 dias em tampão sacarose 30%. Sessões coronais de 30 μ m de espessura foram obtidos no criostato (Leica CM 1850, Wetzlar, Alemanha) em quadruplicata. Uma das quadruplicatas foi processada para imunistoquímica c-Fos e outra foi corada em vermelho neutro (Sigma-Aldrich, St, Louis, EUA) para identificação

dos sítios. As sessões foram lavadas em PBS e incubadas 'overnight' com anticorpo primário (Calbiochem-Merck, Darmstadt, Alemanha) numa sala à temperatura ambiente (24°C). Após a incubação as sessões foram lavadas em PBS e incubadas por 90 min em anticorpo secundário (Vector Laboratories, Burlingame, EUA). As sessões foram então processadas com o complexo Avidina-Biotina (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) por 90 min e reveladas por DAB (Sigma-Aldrich, St, Louis, EUA) que permitiu a visualização de uma reação marrom dentro do núcleo neuronal. Logo após a secagem completa das lâminas a coloração foi intensificada com tetróxido de ósmio e seladas com DPX (Aldrich Chemical Company, EUA) e lamínula.

2.6- Análise Histológica

A densidade de células c-Fos marcadas (número de células/0,1 mm²) foi calculada com o auxílio do programa Image-Pro Plus v7.01 (Media Cybernetics, Rockville, Maryland, EUA). As regiões de interesse foram delimitadas de acordo com o atlas de cérebros de ratos de Paxinos e Watson (2007).

2.7- Registros Comportamentais

Os comportamentos dos animais foram avaliados *off-line* por análise de vídeos obtidos por duas câmeras (NIKON Modelo S-2600 e SONY Modelo DSC-W70). A primeira câmera foi posicionada a aproximadamente 1,20 m acima do assoalho da arena e a segunda 0,80 m à frente do aparato.

Foram realizadas as seguintes medidas espaço-temporais:

- Tempo de permanência do rato nas áreas próxima, intermediária e distante do gato;

- Latência da fuga - tempo gasto pelo rato para a 1º afastamento do gato;
- Tempo de aproximação - tempo gasto em visitas ao setor adjacente até o afastamento permanente do gato;
- Atividade locomotora - número de cruzamentos realizado pelo rato entre os setores;
- Frequência de aproximação - número de visitas do rato ao setor adjacente.

Também foram registrados a duração e a frequência dos seguintes comportamentos (Blanchard, 1989a; Bittencourt et al., 2004):

- Exoftalmia - abertura máxima das pálpebras e protrusão do globo ocular;
- Imobilidade - cessar brusco de todos os movimentos e aumento do tônus muscular;
- Levantar - postura ereta, com extensão das patas posteriores;
- Autolimpeza - manipulação repetitiva dos pelos da cabeça, tronco e genitália, usando as patas dianteiras ou a boca;
- Avaliação de risco - locomoção do corpo para frente, somente com as patas dianteiras sem mover as pata traseiras do local de origem, estendendo o pescoço para frente, ou apenas estendendo o pescoço sem mover as quatro patas;
- Fuga – afastamento do rato da área próxima ao gato apresentando um ou vários dos seguintes comportamentos: trote (locomoção rápida mantendo o padrão contralateral das patas anteriores e posteriores), galope (deslocamento rápido com alternância dos

pares de patas dianteiras e traseiras) e salto (impulso vertical ou oblíquo em direção à borda do aparato).

As medidas espaço-temporais foram analisadas pelo programa Any-maze e os comportamentos por um observador treinado como o auxílio de um cronômetro.

2.8- Análise Estatística

A diferenças de marcação c-Fos nas áreas analisadas e dos comportamentos foram avaliadas por análises de variância de 1-via para cada tratamento (controle, isolamento social neonatal fictício e isolamento social neonatal) seguido por test t de Bonferroni para o nível descritivo de 5%.

3- RESULTADOS

3.1- Comportamento

Durante a confrontação os ratos apresentavam exoftalmia (abertura máxima dos olhos) seguido de avaliação risco (exploração olfatória do ambiente). Logo em seguida os ratos fugiam do setor adjacente para o setor distante do gato. Durante a fuga, os ratos demonstraram predominantemente trote e menos frequentemente galope e, raramente, salto. Alguns ratos faziam ainda uma ou duas visitas ao setor adjacente antes de se afastarem permanentemente do gato permanecendo “congelados” no extremo oposto da caixa até o fim da exposição.

Somente foram detectados diferenças significantes para a latência da fuga ($F_{2,27} = 4,04$; $P < 0,03$); frequência de aproximações ($F_{2,27} = 3,62$; $P < 0,04$); frequência de fugas ($F_{2,27} = 3,45$; $P < 0,05$); frequência de avaliação de risco ($F_{2,27} = 3,21$; $P < 0,05$); e frequência de exoftalmia ($F_{2,27} = 3,40$; $P < 0,05$). Também foram observadas diferenças marginais na duração da fuga ($F_{2,27} = 2,87$; $P < 0,07$) e na duração de imobilidade ($F_{2,27} = 2,99$; $P < 0,07$).

O grupo INS apresentou latência da fuga significativamente menor que o grupo CTR ($\Delta = -78\%$, $p < 0,01$). Contudo, não houve diferenças entre os grupos INS e INF. Além disso, os grupos INF e CTR diferiram entre si. Os ratos INS também apresentaram uma frequência maior de aproximações que os ratos CTR ($\Delta = 138\%$, $p < 0,02$). Consequentemente, os ratos INS apresentaram um aumento significativo na frequência de fuga ($\Delta = 150\%$, $p < 0,02$). O ratos INS também apresentaram aumentos na avaliação de risco ($\Delta = 166\%$, $p < 0,02$) e na frequência de exoftalmia ($\Delta = 233\%$, $p < 0,02$). Por outro lado, os ratos CTR apresentaram durações maiores dos comportamentos de fuga ($\Delta = 40\%$,

$p < 0,03$) e congelamento ($\Delta=16\%$, $p < 0,03$) que os ratos dos grupos de INS e de INF, respectivamente (Tabela 1 e Figura 1).

Não houve diferenças nos tempo nas áreas próxima, intermediária e distante do gato; atividade locomotora e duração e frequência de autolimpeza (“*running*”); levantar e exoftalmia (tabela 1).

Tabela 1 - Duração e frequências dos comportamentos analisados (\pm EPM) dos ratos expostos ao gato. * $P < 0,05$, todos são diferenças significantes em relação ao controle. CTR: controle, INF: isolamento neonatal fictício e INS: isolamento neonatal social.

Comportamento	Tempo (s) ou Frequência \pm EPM		
	CTR	INF	INS
Tempo na área próxima ao gato	47,6 \pm 14,2	22,5 \pm 4,9	42,5 \pm 14,6
Tempo na área longe do gato	547,9 \pm 13,6	555,3 \pm 22,4	542,2 \pm 18,9
Tempo na área intermediária	4,5 \pm 1,8	22,2 \pm 19,0	15,3 \pm 5,5
Latência da fuga	46,1 \pm 14,9	18,1 \pm 5,6 +	10,8 \pm 2,1*
Tempo de afastamento	59,7 \pm 13,7	58,7 \pm 25,3	58,7 \pm 25,3
Atividade locomotora	3,4 \pm 0,9	4,3 \pm 1,2	10,8 \pm 3,4*
Frequência de aproximações	1,3 \pm 0,2	1,6 \pm 0,2	3,1 \pm 0,8*
Tempo de autolimpeza	1,0 \pm 1,0	2,2 \pm 1,3	3,0 \pm 2,1
Frequência de autolimpeza	0,1 \pm 0,1	0,4 \pm 0,2	0,9 \pm 0,6
Tempo de levantar	4,4 \pm 2,1	12,23,7	24,313,1
Frequência de levantar	1,7 \pm 0,7	4,4 \pm 1,3	9,8 \pm 4,2
Tempo de análise de risco	62,9 \pm 11,6	62,9 \pm 11,6	114,3 \pm 28,7
Frequência de análise de risco	5,8 \pm 0,8	11,2 \pm 2,1	16,5 \pm 4,6 *
Tempo de exoftalmia	576,0 \pm 9,9	584,7 \pm 1,1	590,8 \pm 4,4
Frequência de exoftalmia	3,1 \pm 0,2	5,9 \pm 1,0	10,6 \pm 3,4*
Tempo de imobilidade	502,8 \pm 14,9	373,3 \pm 46,3+	424,2 \pm 43,5
Frequência de imobilidade	5,1 \pm 0,9	6,9 \pm 1,5	6,3 \pm 0,8
Tempo de fuga	4,7 \pm 0,8	3,9 \pm 0,5	2,8 \pm 0,3*
Frequência de fuga	1,2 \pm 0,1	1,6 \pm 0,2	3,0 \pm 0,8*

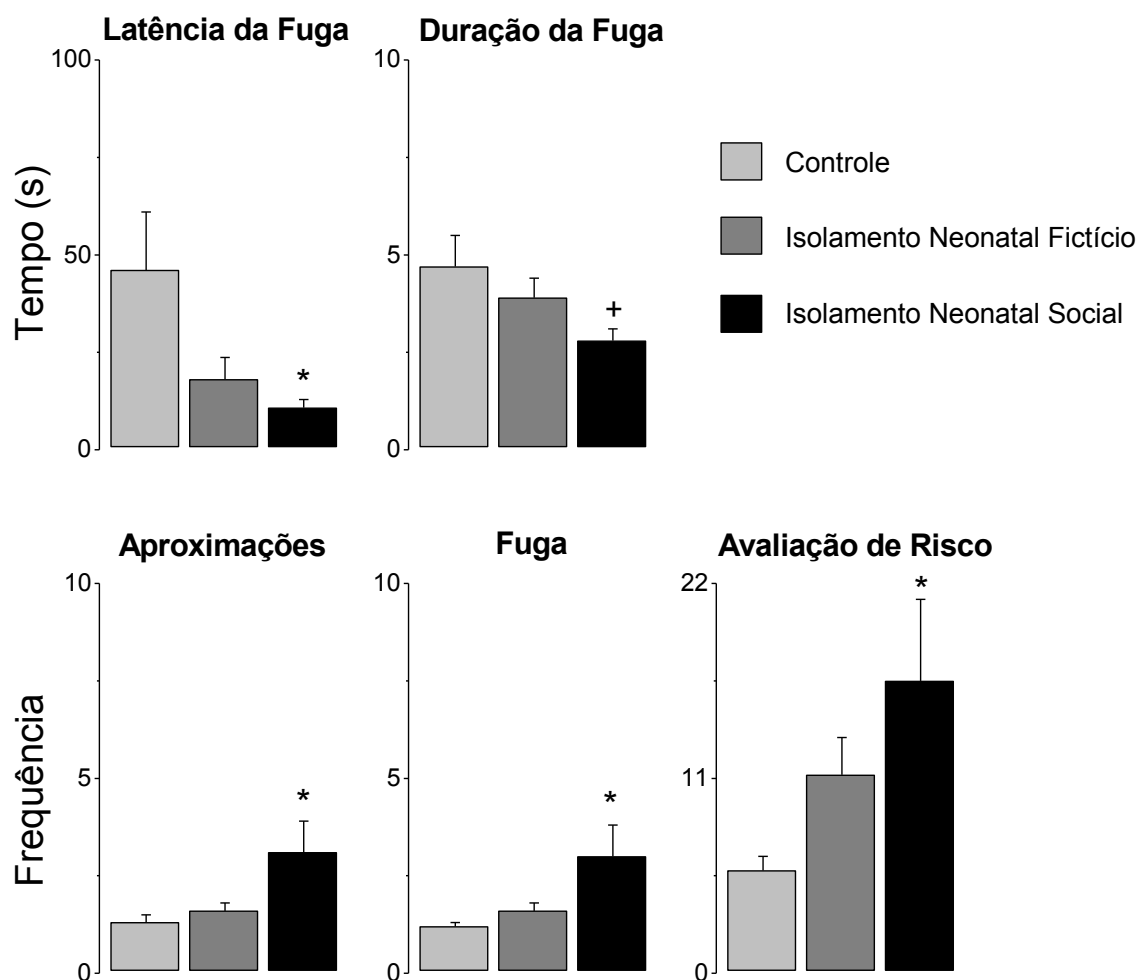


Figura 1 – Tempo ou frequência dos comportamentos dos ratos durante a exposição ao gato. * $P < 0,05$; todos são diferenças significantes em relação ao controle.

3.2- Imunorreatividade c-Fos

Os grupos apresentaram diferenças significantes de IRF da MCPA rostral ($F_{8,18} = 5,71$; $p < 0,001$); intermediária ($F_{11,24} = 4,74$; $p < 0,0007$) e caudal ($F_{11,24} = 7,92$; $p < 0,0001$). Também foram detectados diferenças significantes do PMd ($F_{2,6} = 9,93$; $p < 0,013$) e da HA ($F_{2,6} = 8,41$; $p < 0,02$). Em contraste, não foram observados diferenças significantes no septo lateral ventral (SLv), na área pré-óptico medial (APOme), no hipotálamo lateral (HL), na amígdala

basolateral (ABL), na amígdala central (ACe), na amígdala medial posteroventral (AMepv), no núcleo paraventricular do tálamo (PVT), na habênula lateral medial (HbLm), no cuneiforme (CnF) e no locus cerúleos (LC) (tabela 2).

Na MCPA rostral (β -6,48), a MCPAdl foi mais marcada que a MCPAl para todos os tratamentos INS ($\Delta=220\%$; $t=4,53$; $P<0,003$), INF ($\Delta=255\%$; $t=3,75$; $P<0,001$) e CTR ($\Delta=150\%$; $t=2,46$; $P<0,02$). A MCPAdl dos ratos INS apresentou marcação mais acentuada que a MCPAdm ($\Delta=70\%$, $t=2,72$; $P<0,01$) e MCPAl ($\Delta=220\%$; $t=4,53$; $P<0,003$) do mesmo grupo e que a MCPAdl do grupo CTR ($\Delta=60\%$; $t=-2,48$; $P<0,02$) (tabela 3, figura 2, 3).

Embora os tratamentos não tenha diferidos para a mesma coluna da MCPA intermediária (β -7,08), a MCPAdm apresentou IRF mais acentuada que a MCPAvl nos ratos do INS ($\Delta=174\%$; $t=3,29$; $P<0,003$) e INF ($\Delta=148\%$; $t=2,98$; $P<0,007$). A MCPAdm também foi mais marcada que a MCPAl nos ratos INS ($\Delta=250\%$; $t=3,70$; $P<0,001$) e INF ($\Delta=266\%$; $t=3,62$; $P<0,001$]. Além disso, a MCPAdl apresentou maior IRF que a MCPAl no ratos INS ($\Delta=195\%$; $t=2,89$; $P<0,008$) (tabela 3, figura 2).

Ao nível caudal (β -7,92) a MCPAdl dos ratos INS apresentou IRF mais acentuada que a do grupo CTR ($\Delta=60\%$; $t=-2,55$; $P<0,02$). A MCPAdl também foi mais marcada que a MCPAvl para todos os tratamentos, quais sejam, INS ($\Delta=220\%$; $t=4,66$; $P<0,0001$), INF ($\Delta=210\%$; $t=3,54$; $P<0,002$) e CTR ($\Delta=232\%$; $t=2,95$; $P<0,007$). A MCPAdl também foi mais marcada que a MCPAl nos grupos INS ($\Delta=183\%$; $t=4,39$; $P<0,0002$) e INF ($\Delta=172\%$; $t=3,30$; $P<0,003$). Por sua vez a MCPAdm foi mais marcada que a MCPAvl nos grupos INS ($\Delta=187\%$; $t=3,95$; $P<0,0006$), INF ($\Delta=221\%$; $t=3,71$; $P<0,001$) e CTR ($\Delta=324\%$; $t=3,93$;

$P < 0,0006$); e que a MCPAI nos grupos INS ($\Delta = 153\%$; $t = 3,68$; $P < 0,001$), INF ($\Delta = 181\%$; $t = 3,48$; $P < 0,002$) e CTR ($\Delta = 174\%$; $t = 3,31$; $P < 0,003$) (tabela 3 figura 2).

O PMd dos ratos INS apresentou IRF aumentada tanto em relação ao grupo CTR ($\Delta = 60\%$; $t = -3,97$; $P < 0,007$) quanto em relação ao grupo INF ($\Delta = 54\%$; $t = -3,72$; $P < 0,01$) (tabela 2, figura 4, 5).

O HA também apresentou um aumento significativo da IRF no grupo INS em relação ao grupo CTR ($\Delta = 104\%$; $t = -4,04$; $P < 0,007$). Contudo, o HA dos ratos INS apresentou aumentos apenas marginais da IRF quando comparados ao grupo INF ($\Delta = 49\%$; $t = -2,59$; $P < 0,04$) (tabela 2, figura 4, 6).

Tabela 2 - Densidade de neurônios marcados em $0,1 \text{ mm}^2$. $P < 0,02$.
 * diferenças em relação ao CTR, & diferenças em relação ao INF. CTR: controle, INF: isolamento neonatal fictício e INS: isolamento neonatal social.

Área	Número de células marcadas/ $0,1 \text{ mm}^2 \pm \text{EPM}$		
	CTR	INF	INS
Septo lateral	$45,9 \pm 10,1$	$39,4 \pm 9,7$	$25,7 \pm 8,8$
Pré óptico medial	$14,0 \pm 5,8$	$14,0 \pm 5,8$	$25,8 \pm 10,9$
Hipotálamo anterior	$19,4 \pm 3,7$	$26,8 \pm 3,1$	$39,8 \pm 3,8^*$
Hipotálamo lateral	$17,8 \pm 2,7$	$31,1 \pm 7,3$	$25,8 \pm 8,1$
Pré-mamilar dorsal	$52,7 \pm 3,0$	$54,7 \pm 7,7$	$83,9 \pm 4,9^* \&$
Amígdala basolateral	$11,2 \pm 2,9$	$11,2 \pm 2,9$	$8,6 \pm 2,4$
Amígdala central	$6,1 \pm 1,8$	$6,1 \pm 1,8$	$10,2 \pm 4,3$
Amígdala medial posteroventral	$26,5 \pm 5,6$	$21,7 \pm 4,2$	$26,8 \pm 3,3$
Núcleo paraventricular do tálamo anterior	$56,8 \pm 2,6$	$45,6 \pm 13,6$	$58,2 \pm 11,9$
Núcleo paraventricular do tálamo posterior	$47,1 \pm 5,8$	$37,4 \pm 5,9$	$48,1 \pm 9,5$
Habênula lateral medial	$28,3 \pm 1,3$	$39,7 \pm 14,6$	$32,7 \pm 8,1$
Cuneiforme	$18,5 \pm 6,9$	$17,8 \pm 7,0$	$20,7 \pm 6,1$
Locus Ceruleus	$27,0 \pm 10,6$	$27,0 \pm 10,6$	$30,9 \pm 14,9$

Tabela 3 – Densidade de neurônios marcados em $0,1 \text{ mm}^2$ nas colunas da MCPA. $P < 0,02$. Os símbolos indicam diferenças significantes para uma mesma coluna em relação ao grupo CTR (*), ou para o mesmo tratamento em relação às colunas lateral (+), dorsomedial (@) e ventrolateral (#) da MCPA. CTR: controle, INF: isolamento neonatal fictício e INS: isolamento neonatal social.

Colunas	A.P. (mm)	Número de células marcadas/ $0,1 \text{ mm}^2 \pm \text{EPM}$		
		CTR	INF	INS
Dorsomedial	-6,48	$23,6 \pm 5,6$	$23,4 \pm 7,3$	$28,6 \pm 6,4$
Dorsolateral		$30,4 \pm 4,9^+$	$38,7 \pm 5,7^+$	$48,8 \pm 5,4^{*+@}$
Lateral		$12,1 \pm 3,7$	$12,1 \pm 3,7$	$12,1 \pm 3,7$
Dorsomedial	-7,08	$28,6 \pm 2,3$	$38,6 \pm 11,1^{+ \#}$	$40,1 \pm 8,9^{+ \#}$
Dorsolateral		$24,0 \pm 3,5$	$28,6 \pm 7,2$	$33,8 \pm 5,1^+$
Lateral		$7,9 \pm 2,8$	$10,5 \pm 1,8$	$11,4 \pm 2,3$
Ventrolateral		$8,3 \pm 3,7$	$15,5 \pm 3,7$	$14,6 \pm 4,2$
Dorsomedial	-7,92	$31,1 \pm 2,1^{+ \#}$	$32,2 \pm 2,5^{+ \#}$	$36,3 \pm 9,0^{+ \#}$
Dorsolateral		$25,3 \pm 3,4^{\#}$	$31,2 \pm 3,8^{+ \#}$	$40,5 \pm 5,3^{*+ \#}$
Lateral		$11,3 \pm 1,0$	$11,5 \pm 2,4$	$14,3 \pm 5,5$
Ventrolateral		$7,6 \pm 0,7$	$10,0 \pm 2,2$	$12,6 \pm 5,1$
Dorsomedial	-8,40	$26,5 \pm 11,8$	$28,6 \pm 5,0$	$39,5 \pm 8,9$
Lateral		$17,3 \pm 8,1$	$20,4 \pm 4,6$	$27,1 \pm 7,3$
Ventrolateral		$19,4 \pm 7,3$	$22,8 \pm 8,8$	$26,5 \pm 8,0$

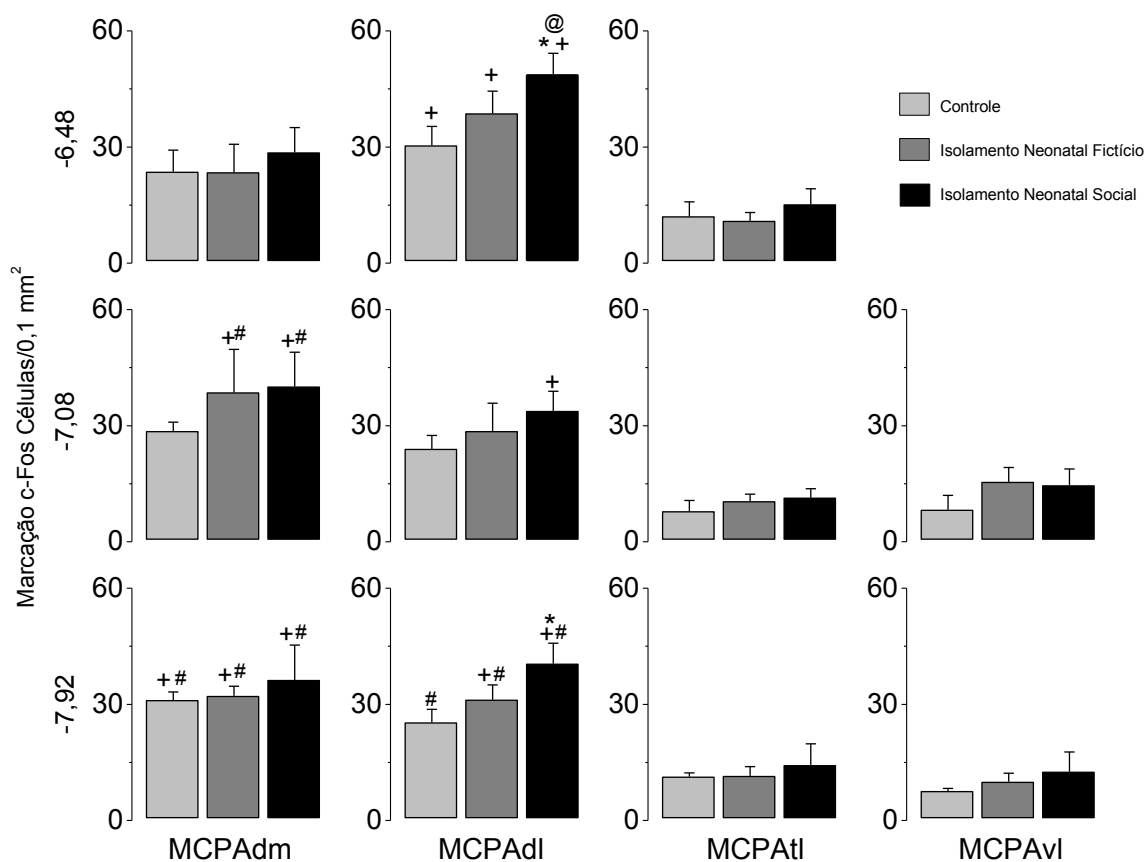


Figura 2 - Densidade de neurônio marcados para proteína c-Fos em três níveis do bregma (β) da MCPA. $P < 0,02$ * diferenças em relação ao CTR, + diferença do mesmo tratamento na coluna lateral da MCPA, @ diferença do mesmo tratamento na coluna dorsomedial da MCPA, # diferença do mesmo tratamento na coluna ventrolateral da MCPA. MCPAdm: matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial; MCPAdl: matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral; MCPAtl: matéria cinzenta periaquedutal lateral; MCPAvl: matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral.

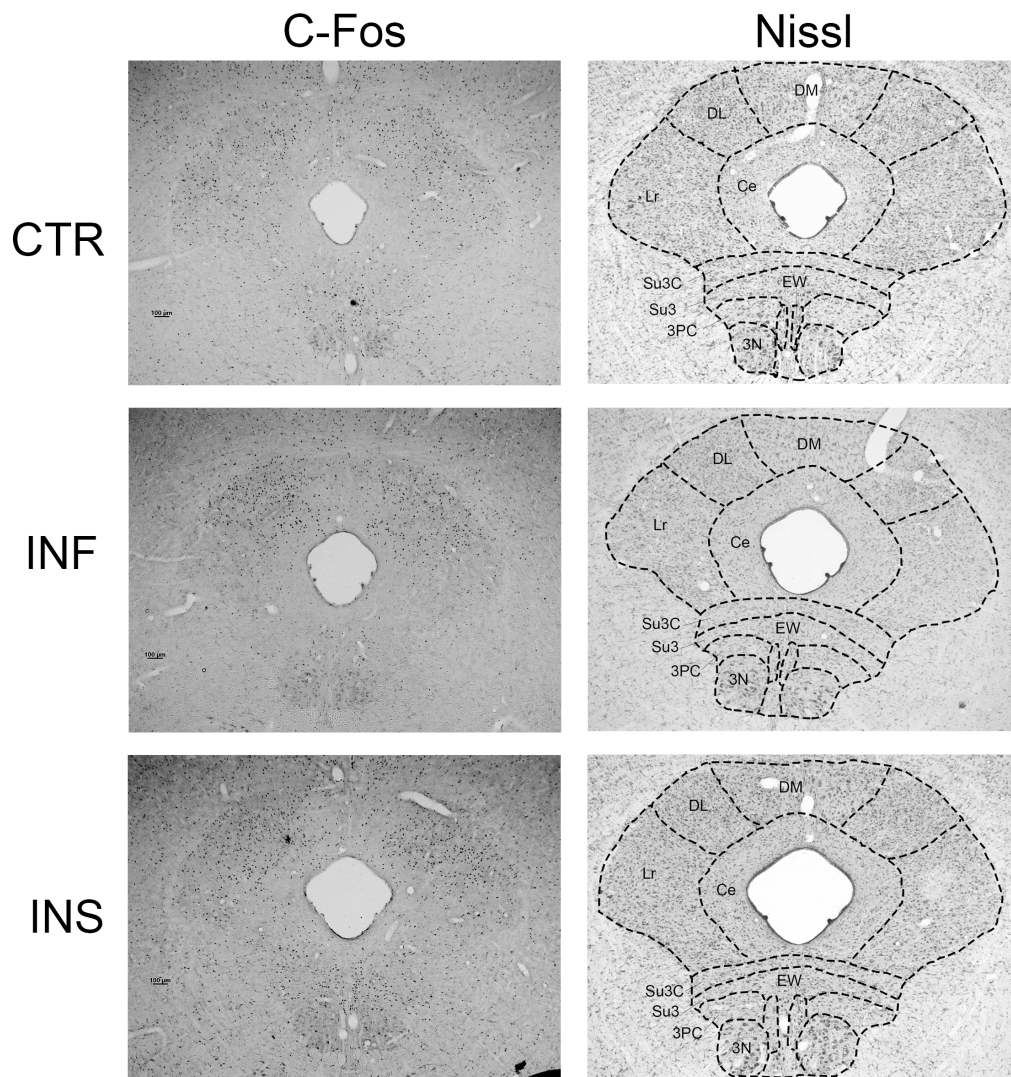


Figura 3 - Expressão da proteína c-Fos (esquerda) e seções adjacentes corada em Nissl (à direita) da matéria cinzenta periaquedutal rostral (-6,48 mm do bregma) de ratos CTR, INF e INS. Abreviaturas: 3N - núcleo oculomotor, MCPAdm - matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial, MCPAdl - substância cinzenta periaquedutal, CTR - controle, INF - isolamento social fictício, INS - isolamento neonatal social

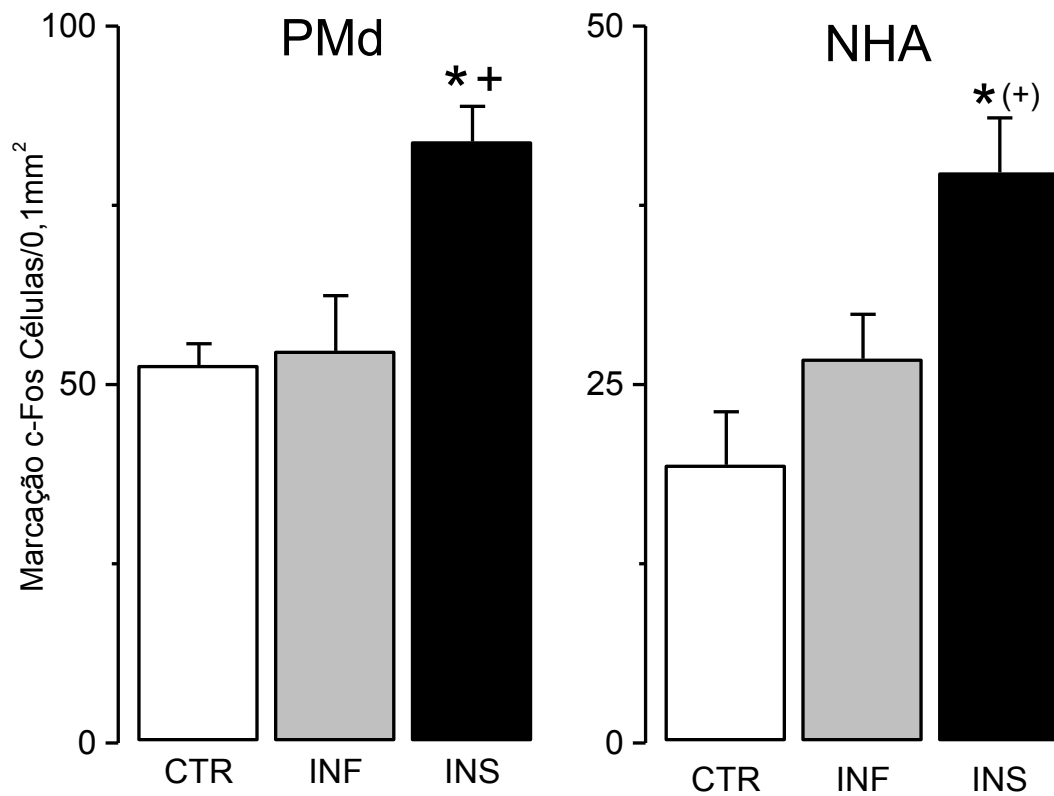


Figura 4 - Número de neurônio marcados para proteína c-Fos no PMd e AHN. $P < 0,02$ * diferenças em relação ao CTR, + diferença em relação ao INF, (-) diferença marginal em relação ao INF. CTR: controle, INF: isolamento neonatal fictício e INS: isolamento neonatal social, PMd: núcleo pré-mamilar dorsal, HA: hipotálamo anterior.

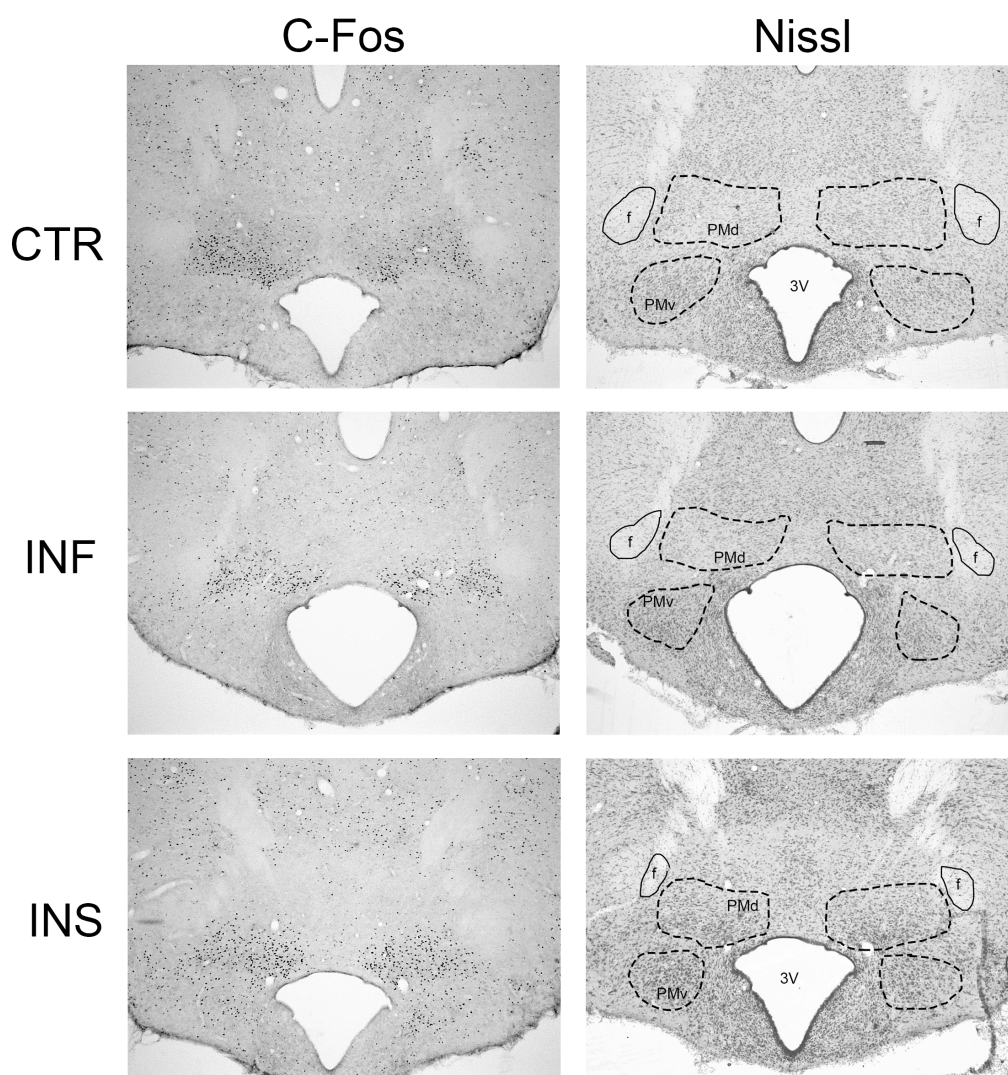


Figura 5 - Expressão da proteína c-Fos (esquerda) e seções adjacentes corada em Nissl (à direita) do núcleo pré-mamilar dorsal (-3,96 mm do bregma) de ratos CTR, INF e INS. Abreviaturas: PMd – núcleo pré-mamilar dorsal, PMv, núcleo pré-mamilar ventral, f, fornix, 3V - terceiro ventrículo, CTR - controle, INF - isolamento neonatal fictício, INS - isolamento neonatal social

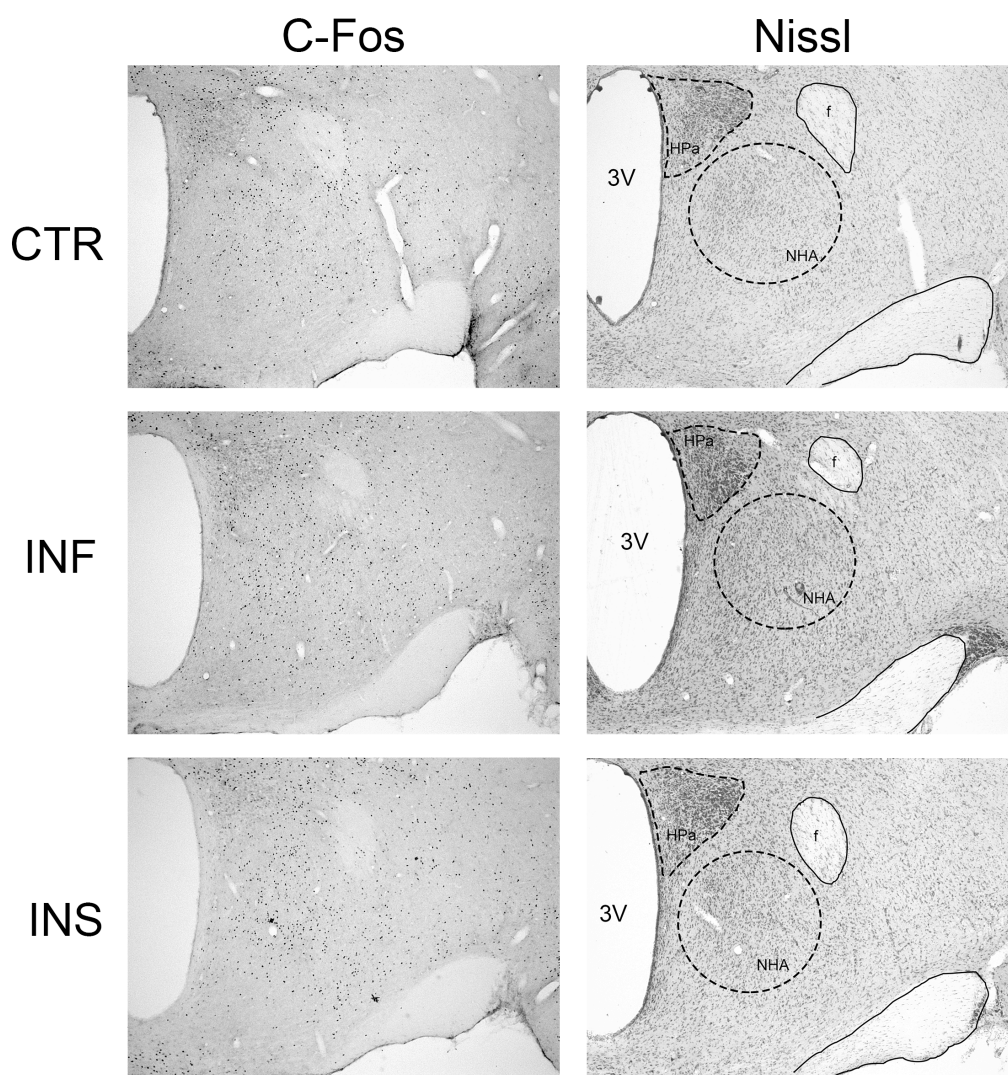


Figura 6 - Expressão da proteína c-Fos (esquerda) e seções adjacentes corada em Nissl (à direita) do núcleo hipotalâmico anterior (-1,56 mm do bregma) de ratos CTR, INF e INS. Abreviaturas: HPa - hipotálamo paraventricular, HA - núcleo hipotalâmico anterior, f, fornix, 3V - terceiro ventrículo, CTR - controle, INF - isolamento social fictício, INS - isolamento neonatal social

DISCUSSÃO

Semelhante ao observado por Blanchard e colaboradores (1989a, 2005), a exposição dos ratos ao gato produziu respostas inatas de medo, tais como imobilidade tensa (congelamento), esquiva e comportamentos de avaliação de risco. No nosso estudo também fizemos medidas adicionais do tempo gasto pelo rato para reagir ao gato no primeiro confronto (latências de fuga) e do número de visitas à área próxima ao gato (frequência de aproximações). Comparados aos ratos CTR, os ratos INS apresentaram uma redução significativa da latência e do tempo de fuga (ou, vice-versa, apresentaram hiperatividade e aumento na velocidade da fuga respectivamente), indicando uma resposta mais vigorosa de medo ou pânico. Os ratos INS também apresentaram frequências aumentadas de exoftalmia, fuga e avaliação de risco (estiramentos atentos ou investigativos). Diferentemente da exposição ao gato de brinquedo (dados não apresentados), os ratos expostos ao gato real fugiram prontamente. Esta resposta era seguida de aproximações e fugas sucessivas que podem ser interpretados como avaliação de risco. A “confirmação” da ameaça resultava no afastamento definitivo do rato para o extremo oposto ao gato, no qual permanecia congelado até o fim do experimento.

Experimentos preliminares (n=2/grupo) mostraram que os ratos que não foram expostos ao gato apresentaram ativações menos intensas nas áreas ativadas pela exposição ao predador (MCPAdl, PMd e HA) quando comparados aos ratos INS, INF e CTR. A IRF foi também mais intensa nas colunas dorsolateral e lateral que nas colunas lateral e ventrolateral da MCPA em todos os grupos. Estes resultados são similares àqueles de estudos

anteriores de exposição ao gato, porém, sem estresse de separação (Canteras et al., 1997; 1999; Comoli et al., 2003). Embora a exposição ao gato tenha marcado as mesmas colunas em todos os grupos, a IRF da MCPAdl do grupo INS foi mais intensa que aquela dos outros grupos. Como a MCPAdl é especificamente marcada pela exposição aos predadores (Canteras et al., 1999; Comoli et al., 2003), estes dados sugerem que o INS promoveu uma sensibilização perene dos circuitos associados à predação.

A IRF do PMd e HA também foi maior nos ratos INS que no grupo CTR. Estas áreas fazem parte do circuito de defesa aos predadores descrito por Canteras e colaboradores (Canteras et al., 1997, 2001, 2003; Canteras e Goto, 1999; Gross e Canteras, 2012). Em particular, estudos de imunoistoquímica mostraram que o processamento hipotálamico de sinais da presença do gato ou do contexto de um confronto prévio com o gato compartilham o mesmo circuito, no qual o PMd desempenha um papel fundamental (Cezário et al., 2008). De fato, lesões no PMd produzem uma redução acentuada da resposta de congelamento do rato ao gato e facilitam comportamentos de avaliação de risco que estão associados a níveis menores de medo. Ratos com lesões no PMd expostos ao gato também apresentam reduções acentuadas da IRF da MCPAdl e MCPAdm rostrais (β -6,48), que são alvos de densas projeções do PMd (Canteras et al., 1997; Blanchard et al., 2003; Cezário et al., 2008). Estes dados sugerem que o aumento da IRF na MCPAdl dos ratos INS possa ser secundário ao aumento da atividade do PMd.

Ratos expostos ao predador ou ao seu odor também apresentam intensa ativação da AMepv. Como esta área é mais ativada na exposição ao odor do gato, ela tem sido associada ao processamento de pistas olfativas da

presença do predador. (Martinez et al., 2011; Dielenberg et al., 2001). Contudo, nossos grupos não diferiram quanto à IRF da AMepv a despeito da robusta marcação do PMd nos ratos INS. Este resultado é notável, uma vez que o PMd é um importante caudatário da última estrutura (Gross e Canteras, 2012). Tampouco foram observadas diferenças de marcação no SL, um alvo preferencial das projeções hipocampais. A ausência de efeitos do INS na AMepv e SL sugere que as ativações mais intensas do HA e PMd possam ter sido devidas à facilitação perene de sistemas intrínsecos destes núcleos durante o estresse de separação na infância.

Canteras e colaboradores (2001) propuseram que outras situações ameaçadoras, que não a exposição ao gato, tais como a exposição ao labirinto em cruz elevado (LCE) e o manuseio dos ratos (estresse de captura), possam induzir aumentos significantes da IRF no PMd, o qual seria ativado por qualquer estressor psicológico que induza medo, como predadores, ambiente aberto ou o próprio experimentador. Contudo, se houve algum efeito, lesões químicas do PMd aumentaram a ansiedade no LCE (Blanchard et al., 2003). Em contraste, elas causaram uma robusta redução das respostas de defesa ao gato. Estes resultados sugerem que o PMd esteja especificamente relacionado ao processamento de estímulos de predadores.

Por sua vez, a ASI tem sido associada ao comportamento ansioso em adultos. Contudo, enquanto alguns autores relataram aumento da ansiedade do LCE em ratos adultos que foram submetidos ao INS de 3 h diárias (Wigger e Neumann, 1999; Park et al., 2005; Pascual e Zamora-Leon, 2007), outros não observaram efeito algum (Savignac et al., 2011; McIntosh et al., 1999). Os últimos estudos são consoantes com dados recentes de nosso laboratório

mostrando que o INS de 3 h diárias ao longo da amamentação, não produz efeito algum no desempenho de ratos adultos expostos ao LCE (Quintino-dos-Santos et al., 2014). Estes resultados foram corroborados por estudos adicionais que aguardam publicação (Bernabé, 2013; Borges, 2015). Portanto, a maioria das evidências sugere que o INS de 3 h diárias não altera o nível de ansiedade dos ratos adultos.

Em contraste, Rachel Klein (1995) mostrou num estudo de follow-up que o aumento da frequência de AP na vida adulta foi o único achado significativo em crianças com ASI comprovada por grave recusa escolar. Por outro lado, Preter e Klein (2008, 2014) sugeriram que a alta comorbidade de TP e ASI deve-se a uma disfunção opioidérgica comum aos sistemas de alarme de sufocamento e separação. De fato, os opióides causam tanto depressão respiratória (Lawson et al., 1979; van der Schier et al., 2014), quanto redução das respostas à ansiedade de separação (Panksepp et al., 1980; Kalin et al., 1995). A associação entre estresse de separação e pânico respiratório também é apoiada por evidências que o INS de 3 h diárias entre PN2 e PN12 causa a facilitação sexo-dependente das respostas respiratórias de ratos adultos à hipóxia (macho) e hipercapnia (fêmea) (Kinkead et al., 2005). Contudo, a maior ameaça a um filhote isolado é a predação e não o sufocamento. Assim, do ponto de vista evolutivo, a ASI estaria mais relacionada ao pânico não-respiratório, tal como sugerem os dados do presente estudo.

Embora os resultados do presente estudo sugiram que o estresse de separação da infância sensibilize o sistema antipredatório, não está claro se a exposição ao gato é um modelo de pânico ou fobia. De fato, enquanto alguns estudos clínicos relacionam o TP com fobia social e fobia simples (Vollebergh

et al., 2001; Segui et al., 1999, 2001), outros estudos relacionam a fobia com TAG (Goisman et al., 1998; Noyes et al., 1992; Noyes, 2001). Não obstante, Tannure e colaboradores (2008) apresentaram evidências pré-clínicas que pânico é distinto de fobia. Estes autores observaram que ratos com fobia ao experimentador (resistência a captura) secundária ao abrasamento (*kindling*) da amígdala apresentavam respostas atenuadas de pânico experimental à estimulação elétrica da MCPA. No conjunto, estes resultados sugerem que o aumento das respostas defensivas e da IRF do circuito antipredação correspondem a um modelo de pânico, e não de fobia.

De fato, enquanto o INS de 3 h diárias facilita a resposta de pânico de ratos adultos à estimulação elétrica da MCPA (Quintino-dos-Santos et al., 2014), ele não teve efeito algum no pânico respiratório à injeções endovenosas de KCN (Schimitel, 2014). Além disso, a administração de uma dose baixa de KCN (40 µg) que eliciu a resposta de fuga em todos os ratos testados, marcou a MCPAI rostral e a MCPAVI caudal, mas não a MCPAdI (ver Estudo I). Sendo assim, nossos dados sugerem que a ASI esteja mais associada ao não-respiratório.

Concluindo o presente estudo mostra que o INS promove a sensibilização perene da circuitaria relacionada à defesa de predadores e sugere que a ASI predispõe o indivíduo ao desenvolvimento de AP não-respiratório na vida adulta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ainsworth MDS and Bowlby J (1991). An ethological approach to personality development. *Am Psychol* 46: 331-341.
- Amano K, Tanikawa T, Iseki H, Kawabatake H, Notani M, Kawamura H, Kitamura K. 1978. Single neuron analysis of the human midbrain tegmentum. *Appl Neurophysiol* 41:66-78.
- American Psychiatric Association (2014). DSM-V: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders of American Psychiatric Association, 5^a Ed., American Psychiatric Press Washington, DC.
- Armini RS, Bernabe CS, Rosa CA, Siller CA, Schimitel FG, Tufik S, Klein DF, Schenberg LC. 2015. In a rat model of panic, corticotropin responses to dorsal periaqueductal gray stimulation depend on physical exertion. *Psychoneuroendocrinology* 53:136-147.
- Ballenger JC (1998). Comorbidity of panic and depression: implications for clinical management. *Int Clin Psychopharmacol* 13: S13-S17.
- Bandler R, Tork I. 1987. Midbrain periaqueductal grey region in the cat has afferent and efferent connection with solitary tract nuclei. *Neurosci Lett* 74:1-6.
- Bandler R, Depaulis A. 1991. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and rat. In: Depaulis A, Bandler R, editors. *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter*. New York: Plenum Press. p 175- 198.
- Bandler R, Keay KA. 1996. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. *Prog Brain*

Res 107:285-300.

Banzett RB, Lansing RW, Reid MB, Adams L, Brown R. 1989. 'Air hunger' arising from increased PCO₂ in mechanically ventilated quadriplegics. *Respir Physiol* 76:53-67.

Banzett RB. 1996. Lansing RW, Evans KC, Shea SA. Stimulus-response characteristics of CO₂-induced air hunger in normal subjects. *Respir Physiol* 103:19-31.

Barnes CD, Eltherington LG. 1973. *Drug Dosage in Laboratory Animals: a Handbook*. Berkeley, CA: University of California Press, p. 209

Battaglia, M., Bertella, S., Politi, E., Bernardeschi, L., Perna, G., Gabriele, A., Bellodi, L., 1995. Age at onset of panic disorder: influence of familial liability to the disease and of childhood separation anxiety disorder. *Am. J. Psychiatry* 152, 1362–1364.

Battaglia M, Bertella S, Ogliari A, Bellodi L, Smeraldi E. 2001. Modulation by muscarinic antagonists of the response to carbon dioxide challenge in panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 58:114-119.

Battaglia, M., et al., 2014. Early-life risk factors for panic and separation anxiety disorder: insights and outstanding questions arising from human and animal studies of CO₂ sensitivity. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.04.005>.

Behbehani MM, Jiang MR, Chandler SD, Ennis M. 1990. The effect of GABA and its antagonists on midbrain periaqueductal gray neurons in the rat. *Pain*

40:195-204.

Bernabé CS. 2013. Efeitos agudos e crônicos da fluoxetina em modelos experimentais de pânico, ansiedade e depressão em ratos adultos submetidos ao isolamento social neonatal. Dissertação de mestrado.

Berquin P, Cayetanot F, Gros F, Larnicol N. 2000. Postnatal changes in Fos- like immunoreactivity evoked by hypoxia in the rat brainstem and hypothalamus. *Brain Res* 877:149-159.

Bett K, Sandkuhler J. 1995. Map of spinal neurons activated by chemical stimulation in the nucleus raphe magnus of the unanesthetized rat. *Neuroscience* 67: 497-504.

Biederman J, Faraone SV, Hirshfeld-Becker DR, Friedman D, Robin JA, Rosenbaum JF. 2001. Patterns of psychopathology and dysfunction in high-risk children of parents with panic disorder and major depression. *Am J Psychiatry*;158:49–57 ;

Biederman J, Petty CR, Faraone SV, Hirshfeld-Becker DR, Henin A, Brauer L. 2006. Antecedents to panic disorder in nonreferred adults. *J Clin Psychiatry*; 67:1179–86. ;

Bienvendu OJ, Onyike CU, Stein MB, Chen LS, Samuels J, Nestadt G. 2006 Agoraphobia in adults: incidence and longitudinal relationship with panic. *Br J Psychiatry*;188:432–8. ;

Bittencourt AS, Carobrez AP, Zamprogno LP, Tufik S, Schenberg LC. 2004. Organization of single components of defensive behaviors within distinct

columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience* 125: 71-89.

Bizzi, E., Libretti, A., Malliani, A., Zanchetti, A., 1961. Reflex chemoceptive excitation of diencephalic sham rage behavior. *Am. J. Physiology* 200, 923–926.

Blanchard RJ, Blanchard DC, Hori K 1989a. Ethoexperimental approaches to the study of defensive behavior, In: Blanchard RJ, Brain PF, Blanchard DC, Parmigiani S, eds, *Ethoexperimental approaches to the study of behavior*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers p, 114-36.

Blanchard, D.C.; Hori, K.; Rodgers, R.J.; Hendrie, C.A.; Blanchard, R.J. 1989b. Differential effects of 5HT_{1A} agonists and benzodiazepines on defensive patterns in wild *Rattus rattus*. In: Bevan, P.; Cools, A.R.; Archer, T., eds. *Behavioral Pharmacology of 5-HT*. New York: Lawrence Earlbaum; 145–149.

Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., Tom, P. and Rodgers, R.J. 1990. Diazepam alters risk assessment in an anxiety/defense test battery. *Psychopharmacology*; 101, 511–518.

Blanchard, D.C., Shepherd, J.K., Rodgers, R.J. and Blanchard, R.J. 1992. Evidence for differential effects of 8-OH-DPAT on male and female rats in the anxiety/defense test battery. *Psychopharmacology*; 106, 531 – 539.

Blanchard DC, Griebel G, Rodgers RJ, Blanchard RJ. 1999. Benzodiazepine and serotonergic modulation of antipredator and conspecific defense. *Neurosci Biobehav Rev.* 1998 Sep;22(5):597-612.

- Blanchard, D.C., Li, C.I., Hubbard, D., Markham, C.M., Yang, M., Takahashi, L.K. & Blanchard, R.J. (2003) Dorsal premammillary nucleus differentially modulates defensive behaviors induced different threat stimuli in rats. *Neurosci. Lett.*, 345, 145–148.
- Blanchard DC, Canteras NS, Markham CM, Pentkowski NS, Blanchard RJ (2005). Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat, *Neurosci Biobehav Rev.* 29(8):1243-53.
- Blandin N, Parquet PJ, Bailly D (1994). Separation anxiety. Theoretical considerations. *Encephale* 20: 121-129.
- Borges A. 2015. Efeitos do período de separação materna e do cuidado materno no momento da reunião do filhote isolado, sobre a ansiedade, depressão e ataques de pânico na vida adulta. Dissertação de mestrado.
- Bowlby J (1983). *Attachment and Loss*. 2^a Ed., New York: Basic Books.
- Brannan S, Liotti M, Egan G, Shade R, Madden L, Robillard R, Abplanalp B, Stofer K, Denton D, Fox PT. 2001. Neuroimaging of cerebral activations and deactivations associated with hypercapnia and hunger for air. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2029-2034.
- Bretherton I (1992). The origins of attachment theory: John Bowlby and Mary Ainsworth. *Dev Psychol* 28: 759-775.

- Brown TA, Barlow DH (1992). Comorbidity among anxiety disorders: implications for treatment and DSM-IV. *J Consult Clin Psychol* 60: 835-844. Caldji et al., 1998
- Brust RD, Corcoran AE, Richerson GB, Nattie E, Dymecki SM. 2014. Functional and developmental identification of a molecular subtype of brain serotonergic neuron specialized to regulate breathing dynamics. *Cell Rep* 9:2152-65.
- Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney MJ (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5335-5340.
- Canteras NS, Chiavegatto S, Ribeiro do Valle LE, Swanson LW (1997). Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res Bull.* 44: 297-305,
- Canteras NS, Goto M (1999). Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *NeuroReport.* 10:413-8.
- Canteras NS, Ribeiro-Barbosa ER, Comoli E (2001) Tracing from the dorsal premammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear response, *Neurosci Biobehav Rev.* 25:661-8.
- Canteras NS (2002). The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacol Biochem Behav.* 71: 481-91.

- Canteras NS (2003). Critical analysis of the neural systems organizing innate fear responses. *Rev Bras Psiquiatr.* 25 Suppl 2:21-4.
- Canteras NS, Graeff FG. 2014. Executive and modulatory neural circuits of defensive reactions: Implications for panic disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 46:352-364.
- Carrive P. 1993. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res* 58:27-47.
- Casanova JP, Contreras M, Moya EA, Torrealba F, Iturriaga R. 2013. Effect of insular cortex inactivation on autonomic and behavioral responses to acute hypoxia in conscious rats. *Behav Brain Res* 253:60-67.
- Cassano GB, Perugi G, Musetti L, Akiskal HS (1989). The nature of depression presenting concomitantly with panic disorder. *Comp Psychiatry* 30: 473-482.
- Cezario AF¹, Ribeiro-Barbosa ER, Baldo MV, Canteras NS. 2008. Hypothalamic sites responding to predator threats--the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. *Eur J Neurosci.* 28(5): 1003-15.
- Coates EL, Li A, Nattie EE. 1993. Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *J Appl Physiol* 75:5-14.
- Comoli E, Ribeiro-Barbosa ER, Canteras NS (2003) Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. *Behav Brain Res.* 138:17-28,

- Cornwall J, Cooper JD, Phillipson OT. 1990. Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat. *Brain Res Bull* 25:271- 284.
- D'Amato FR, Zanettini C, Lampis V, Coccurello R, Pascucci T, Ventura R, Puglisi-Allegra S, Spatola CA, Pesenti-Gritti P, Oddi D, Moles A, Battaglia M (2011). Unstable maternal environment, separation anxiety, and heightened CO2 sensitivity induced by gene-by-environment interplay. *PLoS One* 6, e18637.
- Deakin JFW, Graeff FG (1991) 5-HT and mechanisms of defense. *J Psychopharmacol* 5: 305-315.
- Dielenberg RA, Hunt GE, McGregor IS. (2001) "When a rat smells a cat": the distribution of c-fos expression in rat brain following exposure to a predator odor. *Neuroscience*. 104: 1085-97.
- Dumont FS, Biancardi V, Kinkead R (2011). Hypercapnic ventilatory response of anesthetized female rats subjected to neonatal maternal separation: insight into the origins of panic attacks? *Respir. Physiol. Neurobiol.* 175, 288-295.
- Dunner DL (1998). The issue of comorbidity in the treatment of panic. *Int Clin Psychopharmacology* 13 Suppl 4: S19-24.
- Dunner DL (2001). Management of anxiety disorders: the added challenge of comorbidity. *Depress Anxiety* 13: 57-71.
- Eaton WW, Kessler RC, Wittchen HU, Magee WJ (1994). Panic and panic disorder in the United States. *Am J Psychiatry* 151: 413-20.

- Eison, A.S.; Yocca, F.D.; Taylor, D.P. 1991. Mechanism of action of buspirone: current perspectives. In: Tunnicliff, G.; Eison, A.S.; Taylor, D.P., eds., *Buspirone: Mechanisms and Clinical Aspects*. San Diego: Academic Press; 279–326.
- Faure J, Uys JDK, Marais L, Stein DJ, Daniels WMU (2007). Early maternal separation alters the response to traumatization: resulting in increased levels of hippocampal neurotrophic factors. *Metab Brain Dis* 22: 183-195.
- Field T, Healy B, Goldstein S, Perry S, Bendell D, Schanberg S, Zimmerman EA, Kuhn C (1988). Infants of depressed mothers show "depressed" behavior even with nondepressed adults. *Child Dev* 59: 1569-1579.
- Franchini KG, Krieger EM. 1993. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *J Auton Nerv Syst* 42:63-69.
- Franchini KG, Oliveira VL, Krieger EM. 1997. Hemodynamics of chemoreflex activation in unanesthetized rats. *Hypertension* 30:699-703.
- Francis DD and Meaney MJ (1999). Maternal care and the development of stress responses. *Curr Opin Neurobiol* 9: 128-134.
- Garakani A, Win T, Virk S, Gupta S, Kaplan D, Masand PS. 2003. Comorbidity of irritable bowel syndrome in psychiatric patients: a review. *Am J Ther*; 10: 61-7.

- Genest SE, Gulemetova R, Laforest S, Drolet G, Kinkead R (2004). Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat. *J Physiol* 554: 543-557
- Genest SE, Balon N, Laforest S, Drolet G, Kinkead R (2007a). Neonatal maternal separation and enhancement of the hypoxic ventilatory response in rat: the role of GABAergic modulation within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Physiol* 583: 299-314.
- Genest SE, Gulemetova R, Laforest S, Drolet G, Kinkead R (2007b). Neonatal maternal separation induces sex-specific augmentation of the hypercapnic ventilatory response in awake rat. *J Appl Physiol* 102: 1416-1421.
- Gentil V (1988). The aversive System, 5-HT and panic attacks. In: P Simon, P Soubri  and D Wildlocher (Eds). *Animal Models of Psychiatric Disorders*. Karger: Basel, p. 142-145.
- Goetz RR, Klein DF, Gorman JM. 1996. Symptoms essential to the experience of sodium lactate-induced panic. *Neuropsychopharmacology* 14:355-366.
- Goisman RM, Allsworth J, Rogers MP, Warshaw MG, Goldenberg I, Vasile RG. 1998. Simple phobia as a comorbid anxiety disorder. *Depress Anxiety*; 7:105–12.
- Goodwin R, Lipsitz JD, Chapman TF, Mannuzza S, Fyer AJ. 2001. Obsessive-compulsive disorder and separation anxiety co-morbidity in early onset panic disorder. *Psychol Med*. 31: 1307–10.

- Goossens L, Leibold N, Peeters R, Esquivel G, Knuts I, Backes W, et al. Brainstem response to hypercapnia: a symptom provocation study into the pathophysiology of panic disorder. *J Psychopharmacol* 2014 May;28(5):449-56.
- Gorman JM (1996). Comorbid depression and anxiety spectrum disorders. *Depress Anxiety* 4: 160-168.
- Gorman JM, Coplan JD (1996). Comorbidity of depression and panic disorder. *J Clin Psychiat* 57: S34-S41.
- Griebel, G Blanchard, D C Blanchard, R J (1996). Predator-elicited flight responses in Swiss-Webster mice: an experimental model of panic attacks.
- Gross CT, Canteras NS (2012). The many paths to fear. *Nature Review Neuroscience* 13(9):651-658.
- Gunnar MR (2003). Integrating neuroscience and psychological approaches in the study of early experiences. *Ann N Y Acad Sci* 1008: 238-247.
- Guyenet PG, Koshiya N (1995). Working model of the sympathetic chemoreflex in rats. *Clin. Exp.Hypertens.* 17: 167–179.
- Hayward LF, Von Reitzentstein M (2002) c-Fos expression in the midbrain periaqueductal gray after chemoreceptor and baroreceptor activation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 283: H1975-H1984.
- Heim C, Nemeroff CB (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 49: 1023-1039.

- Hilton, S.M., Joels, N., 1965. Facilitation of chemoreceptor reflexes during the defence reaction. *J. Physiol.* 176, 20–22.
- Holstege G, Kerstens L, Moes MC, Vanderhorst VG. 1997. Evidence for a periaqueductal gray-nucleus retroambiguus-spinal cord pathway in the rat. *Neuroscience* 80:587-598.
- Horn EM, Kramer JM, Waldrop TG. 2000. Development of hypoxia-induced Fos expression in rat caudal hypothalamic neurons. *Neuroscience* 99:711-20.
- Jansen AS, Farkas E, Mac SJ, Loewy AD. 1998. Local connections between the columns of the periaqueductal gray matter: a case for intrinsic neuromodulation. *Brain Res* 784:329-336.
- Jenck F, Moreau JL, Martin JR (1995). Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res* 57: 181-191.
- Johnson MR, Lydiard RB (1998). Comorbidity of major depression and panic disorder. *J Clin Psychol* 54: 201-210.
- Johnson PL, Fitz SD, Hollis JH, Moratalla R, Lightman SL, Shekhar A, et al. 2011. Induction of c-Fos in 'panic/defence'-related brain circuits following brief hypercarbic gas exposure. *J Psychopharmacol* 25:26-36.
- Jones SE, Saad M, Lewis DI, Subramanian HH, Dutschmann M. 2012. The nucleus retroambiguus as possible site for inspiratory rhythm generation caudal to obex. *Respir Physiol Neurobiol* 180:305-10.
- Kalin NH, Shelton SE, Lynn DE. Opiate systems in mother and infant primates

coordinate intimate contact during reunion. *Psychoneuroendocrinology* 1995; 20:735-42.

Kaufman J, Charney D (2000). Comorbidity of mood and anxiety disorders. *Depress Anxiety* 12: 69-76.

Kaye J, Buchanan F, Kendrick A, Johnson P, Lowry C, Bailey J, Nutt D, Lightman S (2004). Acute carbon dioxide exposure in healthy adults: evaluation of a novel means of investigating the stress response. *J. Neuroendocrinol.* 16: 256-264.

Keay KA, Bandler R. 2004. Periaqueductal Gray. In: Paxinos G, editor. *The Rat Nervous System*. San Diego: Elsevier. p 243-257.

Kendler KS, Neale MC, Kessler RC, Heath AC, Eaves LJ (1992). Childhood parental loss and adult psychopathology in women. A twin study perspective. *Arch Gen Psychiatry* 49: 109-116.

Kinkead R, Genest SE, Gulemetova R, Lajeunesse Y, Laforest S, Drolet G, Bairam A (2005). Neonatal maternal separation and early life programming of the hypoxic ventilatory response in rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 149, 313-324.

Klein, D.F., 1964. Delineation of two drug-responsive anxiety syndromes. *Psychopharmacologia* 5, 397–408.

Klein DF (1980). Anxiety reconceptualized: early experience with imipramine and anxiety. *Compr Psychiatry* 2: 411-427.

- Klein DF (1993a). Panic may be a misfiring suffocation alarm. In: SA Montgomery (Ed.). *Psychopharmacology of panic*. New York: Oxford University Press, p. 67-73.
- Klein DF (1993b). False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. *Arch Gen Psychiatry* 50: 306-318.
- Klein DF (1995). Respiration disorders in panic attacks. *J Am Med Assoc* 274(19). 1504.
- Klein, R.G., 1995. Is panic disorder associated with childhood separation anxiety disorder? *Clin. Neuropharmacol.* 18, S7–S14.
- Kossowsky, J., Wilhelm, F.H., Schneider, S., 2013. Responses to voluntary hyperventilation in children with separation anxiety disorder: Implications for the link to panic disorder. *J. Anxiety Disord.* 27, 627–634.
- Kramer JM, Nolan PC, Waldrop TG. 1999. In vitro responses of neurons in the periaqueductal gray to hypoxia and hypercapnia. *Brain Res* 835:197-203.
- Kuhn CM and Schanberg SM (1998). Responses to maternal separation mechanisms and mediators. *Int J Dev Neuroscience* 16: 261-270.
- Kumar K, Toth C, Nath RK. 1997. Deep brain stimulation for intractable pain: a 15-year experience. *Neurosurgery* 40:736-46.
- Larnicol N, Wallois F, Berquin P, Gros F, Rose D (1994). c-Fos-like immunoreactivity in the cat's neuraxis following moderate hypoxia or hypercapnia. *Journal Physiology (Paris)* 88, 81-88.

- Lawson EE, Waldrop TG, Eldridge FL. Naloxone enhances respiratory output in cats. *J Appl Physiol* 1979; 47:1105-11.
- Levin AP, Doran AR, Liebowitz MR, Fyer AJ, Gorman JM, Klein DF, Paul SM. 1987. Pituitary adrenocortical unresponsiveness in lactate-induced panic. *Psychiatry Res* 21:23-32.
- Liebowitz MR, Gorman JM, Fyer AJ, Levitt M, Dillon D, Levy G, Appleby IL, Anderson S, Palij M, Davies SO. 1985. Lactate provocation of panic attacks. II. Biochemical and physiological findings. *Arch Gen Psychiatry* 42:709-719.
- Loewy AD, Wallach JH, Kellar S. 1981. Efferent connections of the ventral medulla oblongata in the rat. *Brain Res Rev* 3:63-80.
- Lv BC, Ji GL, Huo FQ, Chen T, Li H, Li YQ. 2010. Topographical distributions of endomorphinergic pathways from nucleus tractus solitarii to periaqueductal gray in the rat. *J Chem Neuroanat* 39:166-174.
- Maldonado L, Huang Y, Chen R, Kasen S, Cohen P, Chen H (2013). Impact of early adolescent anxiety disorders on self-esteem development from adolescence to young adulthood. *J Adolesc Health*. 53(2):287-92
- Manicavasagar V, Silove D, Hadzi-Pavlovic D (1998). Subpopulations of early separation anxiety: relevance to risk of adult anxiety disorders. *J Affect Disorders* 48: 181-190.

- Martinez RC, Carvalho-Neto EF, Ribeiro-Barbosa ER, Baldo MVC, Canteras NS (2011). Amygdalar roles during exposure to a live predator and to a predator associated context. *Neuroscience* 172: 314-328.
- McIntosh J, Anisman H, Merali Z 1999 Short-and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain Res Dev Brain Res* 113:97-106
- Meaney MJ, Bhatnagar S, Diorio J, Larocque S, Francis D, O'Donnell D, Shanks N, Sharma S, Smythe J, Viau V (1993). Molecular basis for the development of individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response. *Cell Mol Neurobiol* 13: 321-347.
- Mezzasalma MA, Valença AM, Lopes FL, Nascimento I, Zin WA, Nardi AE (2004). Neuroanatomy of panic disorder. *Rev Bras Psiquiatr* 26: 202-6.
- Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, Dolan RJ, Frith CD. 2007. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science* 317:1079-1083.
- Moosavi SH, Banzett RB, Butler JP. 2004. Time course of air hunger mirrors the biphasic ventilatory response to hypoxia. *J Appl Physiol* 97:2098-2103.
- Morgan MM, Carrive P. 2001. Activation of the ventrolateral periaqueductal gray reduces locomotion but not mean arterial pressure in awake, freely moving rats. *Neuroscience* 102:905-910.
- Mota-Ortiz SR, Sukikara MH, Felicio LF, Canteras NS. 2009. Afferent connections to the rostralateral part of the periaqueductal gray: a critical

region influencing the motivation drive to hunt and forage. *Neural Plast* 2009;612698:612698.

Nashold BSJr, Wilson WP, Slaughter DG (1969). Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 30: 14-24.

Newport DJ, Stowe ZN, Nemeroff CB (2002). Parental depression: animal models of an adverse life event. *Am J Psychiatry* 159: 1265-1283.

Noyes Jr R, Woodman C, Garvey MJ, Cook BL, Suelzer M, Clancy J. Generalized anxiety disorder vs. panic disorder. Distinguishing characteristics and patterns of comorbidity. *J Nerv Ment Dis* 1992;180:369–79.;

Noyes Jr R. Comorbidity in generalized anxiety disorder. *Psychiatr Clin North Am* 2001;24:41–55.

Onstott D, Mayer B, Beitz AJ. 1993. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: analysis using laser confocal microscopy. *Brain Res* 610:317-324.

Panksepp J, Herman BH, Vilberg T, Bishop P, DeEskinazi FG. 1980 Endogenous opioids and social behavior. *Neurosci Biobehav Rev* ; 4:473-87.

Panneton WM, Loewy AD. 1980. Projections of the carotid sinus nerve to the nucleus of the solitary tract in the cat. *Brain Res* 191: 239-44.

Park HJ, Chae Y, Jang J, Shim I, Lee H, Lim S (2005). The effect of acupuncture

on anxiety and neuropeptide Y expression in the basolateral amygdala of maternally separated rats. *Neurosci Lett* 377:179-184.

Pascual R, Zamora-Leon SP. 2007 Effects of neonatal maternal deprivation and postweaning environmental complexity on dendritic morphology of prefrontal pyramidal neurons in the rat. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 67:471-479.

Paxinos G, Watson C. 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.

Paxinos G, Watson C, Carrive P, Kirkcaldie M, Ashwell KW. 2009. *Chemoarchitectonic Atlas of the Rat Brain*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier;.

Perna G, Caldirola D, Namia C, Cucchi M, Vanni G, Bellodi L. 2004. Language of dyspnea in panic disorder. *Depress Anxiety* 20:32-38.

Preter M and Klein DF (2008). Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 32: 603-612.

Preter M, Klein DF. 2014. Lifelong opioidergic vulnerability through early life separation: A recent extension of the false suffocation alarm theory of panic disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 345-351.

Quintino-dos-Santos JW, Muller CJ, Bernabe CS, Rosa CA, Tufik S, Schenberg LC (2014). Evidence that the periaqueductal gray matter mediates the facilitation of panic-like reactions in neonatally-isolated adult rats. *PLoS One* 9, e90726.

- Raff H, Shinsako J, Keil LC, Dallman MF (1983). Vasopressin, ACTH, and corticosteroids during hypercapnia and graded hypoxia in dogs. *Am. J. Physiol.* 244, E453-E458.
- Raff H, Shinsako J, Dallman MF (1984). Renin and ACTH responses to hypercapnia and hypoxia after chronic carotid chemodenervation. *Am. J. Physiol.* 247, R412-R417.
- Rinne T, Westenberg HGM, den Boer JA, van den Brink W (2000). Serotonergic blunting to meta-chlorophenylpiperazine (m-CPP). highly correlates with sustained childhood abuse in impulsive and autoaggressive female borderline patients. *Biol Psychiatry* 47: 548-556.
- Roberson-Nay, R., Klein, D.F., Klein, R.G., Mannuzza, S., Moulton III, J.L., Guardino, M., Pine, D.S., 2010. Carbon dioxide hypersensitivity in separation-anxious offspring of parents with panic disorder. *Biol. Psychiatry* 67, 1171–1177.
- Roberson-Nay R, Kendler KS. 2011. Panic disorder and its subtypes: a comprehensive analysis of panic symptom heterogeneity using epidemiological and treatment seeking samples. *Psychol Med* 41:2411-2421.
- Roberson-Nay, R., Eaves, L.J., Hettema, J.M., Kendler, K.S., Silberg, J.L., 2012a. Childhood separation anxiety disorder and adult onset panic attacks share a common genetic diathesis. *Depress. Anxiety* 29, 320–327.

- Roberson-Nay, R., Latendresse, S.J., Kendler, K.S., 2012b. A latent class approach to the external validation of respiratory and non-respiratory panic subtypes. *Psychol. Med.* 42, 461–474.
- Ruiz-Torner A, Olucha-Bordonau F, Valverde-Navarro AA, Martinez-Soriano F. 2001. The chemical architecture of the rat's periaqueductal gray based on acetylcholinesterase histochemistry: a quantitative and qualitative study. *J Chem Neuroanat* 21:295-312.
- Ryan JW, Waldrop TG (1995). Hypoxia sensitive neurons in the caudal hypothalamus project to the periaqueductal gray. *Resp. Physiol.* 100, 185-194.
- Savignac HM, Dinan TG, Cryan JF (2011) Resistance to early-life stress in mice: effects of genetic background and stress duration. *Front Behav Neurosci* 5:13.
- Schenberg LC, Vasquez EC, da Costa MB. 1993. Cardiac baroreflex dynamics during the defence reaction in freely moving rats. *Brain Res* 621:50-58.
- Schenberg LC, Lovick TA. 1995. Attenuation of the midbrain-evoked defense reaction by selective stimulation of medullary raphe neurons in rats. *Am J Physiol* 269:R1378-R1389.
- Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré EC, Vargas LC (2001). Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 647-659.
- Schenberg LC, Capucho LB, Vatanabe RO, Vargas LC (2002). Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked

unconditioned defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 159: 138-144.

Schenberg LC, Póvoa RMF, Costa ALP, Caldellas AV, Tufik S, Bittencourt AS (2005). Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 279-1298.

Schenberg LC. 2010. Towards a translational model of panic attack. *Psychol Neurosci* 3:9-37.

Schenberg LC, Schimitel FG, Armini RS, Bernabe CS, Rosa CA, Tufik S, Muller CJ, Quintino-Dos-Santos JW. 2014. Translational approach to studying panic disorder in rats: hits and misses. *Neurosci Biobehav Rev* 46:472-496.

Schimitel FG, Almeida GM, Pitol DN, Armini RS, Tufik S, Schenberg LC (2012). Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience* 200, 59-73.

Schimitel FG, Müller CJT, Tufik S, Schenberg LC (2014). Evidence of a suffocation alarm system sensitive to clinically-effective treatments with the panicolytics clonazepam and fluoxetine. *J. Psychopharmacol.* 28:1184-1128.

Schimitel, 2014. Evidência de um Sistema de Alarme de Sufocamento na Matéria Cinzenta Periquedutal dorsal de ratos: Efeitos do Isolamento Neonatal e de Tratamentos com panicolíticos clinicamnet eficazes. Tese de Doutorado.

- Schneier FR, Johnson J, Hornig CD, Liebowitz MR, Weissman MM (1992). Social phobia, Comorbidity and morbidity in an epidemiologic sample. *Arch Gen Psychiatry*. 49(4):282-8,
- Segui J, Marquez M, Garcia L, Canet J, Salvador-Carulla L, Ortiz M. 1999. Differential clinical features of early-onset panic disorder. *J Affect Disord*;54:109–17
- Segui J, Marquez M, Garcia L, Canet J, Salvador-Carulla L, Ortiz M. 2000. Depersonalization in panic disorder: a clinical study. *Compr Psychiatry*;41: 172–8.
- Shekhar, A., Keim, S.R., Simon, J.R., McBride, W.J., 1996. Dorsomedial hypothalamic GABA dysfunction produces physiological arousal following sodium lactate infusions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 55, 249–256.
- Shepherd, J.K. and Rodgers, R.J. 1990. 8-OH-DPAT specifically enhances feeding behaviour in mice: evidence from behavioural competition. *Psychopharmacology*; 101, 408–413.
- Sinha SS, Coplan JD, Pine DS, Martinez JA, Klein DF, Gorman JM. 1999. Panic induced by carbon dioxide inhalation and lack of hypothalamic- pituitary-adrenal axis activation. *Psychiatry Res* 86:93-98.
- Smith GST, Savery D, Marden C, Costa JJL, Averill S, Priestley JV, Rattray M. 1994. Distribution of messenger RNAs encoding enkephalin, substance P, somatostatin, galanin, vasoactive intestinal polypeptide, neuropeptide Y, and calcitonin gene related peptide in the midbrain periaqueductal grey in the rat. *J Comp Neurol* 350:23-40.

- Spiacci A, Jr., de Oliveira ST, da Silva GS, Glass ML, Schenberg LC, Garcia-Cairasco N, Zangrossi H, Jr. 2015. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray inhibits panic-like defensive behaviors in rats exposed to acute hypoxia. *Neuroscience* 307:191-198.
- Stein, M.B., Walker, J.R., Anderson, G., Hazen, A.L., Ross, C.A., Eldridge, G., Forde, D.R., 1996. Childhood physical and sexual abuse in patients with anxiety disorders and in a community sample. *Am. J. Psychiatry* 153, 275–277.
- Subramanian HH, Balnave RJ, Holstege G. 2008. The midbrain periaqueductal gray control of respiration. *J Neurosci* 28:12274-12283.
- Subramanian HH, Holstege G. 2013. Stimulation of the midbrain periaqueductal gray modulates pre-inspiratory neurons in the ventrolateral medulla in the in vivo rat. *J Comp Neurol* 521:3083-3098.
- Suchecki D, Rosenfeld P, Levine S. 1993. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the role of feeding and stroking. *Dev Brain Res*; 75:192-5.
- Sukikara MH, Mota-Ortiz SR, Baldo MV, Felicio LF, Canteras NS. A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. *J Neurosci* 2006 Mar 1;26(9):2583-9.
- Tannure, R.M., Bittencourt, A.S., Schenberg, L.C., 2009. Short-term full kindling of the amygdala dissociates natural and periaqueductal gray-evoked flight behaviors of the rat. *Behav. Brain Res.* 199, 247–256.

- Teicher MH, Andersen SL, Polcari A, Anderson CM, Navalta CP, Kim DM (2003). The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 33-44.
- Teixeira KV, Carobrez AP. 1999. Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats' performance in the elevated plus-maze task. *Behav Neurosci* 113:196-203.
- Teppema LJ, Veening JG, Kranenburg A, Dahan A, Berkenbosch A, Olivier C (1997). Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *J. Comp Neurol.* 388, 169-190.
- Tweed, J.L., Schoenbach, V.J., George, L.K., Blazer, D.G., 1989. The effects of childhood parental death and divorce on six-month history of anxiety disorders. *Br. J. Psychiatry* 154, 823–828.
- Unnewehr S, Schneider S, Florin I, Margraf J. 1998. Psychopathology in children of patients with panic disorder or animal phobia. *Psychopathology*;31:69–84.
- Van der Schier R, Roozkrans M, van VM, Dahan A, Niesters M. Opioid-induced respiratory depression: reversal by non-opioid drugs. *F1000Prime Rep* 2014; 6:79.
- Vargas LC, Schenberg LC (2001). Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 155: 260-268.

- Verburg C, Griez E, Meijer J. 1994. A 35% carbon dioxide challenge in simple phobias. *Acta Psychiatr Scand*;90:420–3.
- Vollebergh WA, Ledema J, Bijl RV, de GR, Smit F, Ormel J. 2001. The structure and stability of common mental disorders: the NEMESIS study. *Arch Gen Psychiatry*;58:597–603.
- Wigger A, Neumann ID (1999) Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiol Behav* 66:293-302